FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1923

THÈSE

N° 253

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PRÉSENTÉE PAR

M. CRETIN

De quelques Méthodes de recherche du Phosphore et de la Chaux dans les Tissus

Président de Thèse : M. Le Professeur PRENANT

PARIS
LIBRAIRIE MARCEL VIGNÉ
13, RUE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE, 13
—
1923

253

THÈSE

POUR LE DOCTORAT

EN MÉDECINE

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1923 **THÈSE** N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

PRÉSENTÉE PAR

M. CRETIN

De quelques Méthodes de recherche du Phosphore et de la Chaux dans les Tissus

Président de Thèse : M. LE PROFESSEUR PRENANT

PARIS
LIBRAIRIE MARCEL VIGNÉ
13, RUE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE, 13
—
1923

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

DOYEN DE LA FACULTÉ : M. ROGER.	MM.
Anatomie	NICOLAS.
Anatomie médico-chirurgicale	CUNÉO.
Physiologie	RICHET.
Physique médicale	André BROCA.
Chimie organique et chimie générale	DESGREZ.
Bactériologie	BEZANÇON.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales	Marcel LABBÉ.
Pathologie médicale	N...
Pathologie chirurgicale	LECÈNE.
Anatomie pathologique	LETULLE.
Histologie	PRENANT.
Pharmacologie et matière médicale	RICHAUD.
Thérapeutique	CARNOT.
Hygiène	Léon BERNARD.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	MÉNÉTRIER.
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER.
Clinique médicale	ACHARD. WIDAL. GILBERT. CHAUFFARD.
Hygiène et clinique de la première enfance	MARFAN.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JEANSELME.
Clinique des maladies du système nerveux	P. MARIE.
Clinique des maladies contagieuses	TEISSIER.
Clinique chirurgicale	DELBET. LEJARS. HARTMANN. GOSSET.
Clinique ophtalmologique	DE LAPERSONNE.
Clinique des maladies des voies urinaires	LEGUEU.
Clinique d'accouchements	BRINDEAU. COUVELAIRE. JEANNIN.
Clinique gynécologique	FAURE.
Clinique chirurgicale infantile	Auguste BROCA.
Clinique thérapeutique	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique	SEBILLEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale	DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGENT.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.			
ABRAMI.	DESMAREST.	LARDENNOIS.	RATHERY.
ALGLAVE.	DUVOIR.	LE LORIER.	RETTERER.
BASSET.	FIESSINGER.	LEMIERRE.	RIBIERRE.
BAUDOUIN.	GARNIER.	LEQUEUX.	ROUSSY.
BLANCHETIÈRE	GOUGEROT.	LEREBOULLET.	ROUVIÈRE.
BRANCA.	GRÉGOIRE.	LERI.	SCHWARTZ.
CAMUS.	GUENIOT.	LÉVY-SOLAL.	STRROHL.
CHAMPY.	GUILLAIN.	MATHIEU.	TANON.
CHEVASSU.	HEITZ-BOYER.	METZGER.	TERRIEN.
CHIRAY.	JOYEUX.	MOCQUOT.	TIFFENEAU.
CLERC.	LABBÉ (H.).	MULON.	VILLARET.
DEBRÉ.	LAIGNEL-LAVASTINE.	OKINCZYC.	
	LANGLOIS.	PHILIBERT.	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n entend leur donner aucune approbation ni improbation

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MON PERE

A MA MERE

En témoignage de ma profonde affection.

A MON PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR PRENANT

Qui a bien voulu me faire l'honneur de présider cette thèse.

À Monsieur le Professeur agrégé BRANCA,

En témoignage de ma respectueuse et fidèle affection.

A MES MAITRES :

M. le Professeur Segond (*in memoriam*);
M. le Professeur Cunéo;
M. le Docteur L. Fournier;
M. le Docteur Lion;
M. le Docteur Richardière.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547504_0045

INTRODUCTION

A) Méthodes de recherche.

a) *Méthodes cristallographiques ou chimiques pures.*

1° Réactions de la chaux.

2° Réactions du phosphore.

b) *Méthodes employant des réactifs colorants.*

1° Réactions colorées de la chaux.

2° Réactions colorées du phosphore.

B) Résultats biologiques.

a) *Hépato-pancréas des Gastéropodes pulmonés, type Helix.*

b) *Tissus de soutien (Vertébrés).*

C) Conclusions.

De quelques méthodes de recherche du Phosphore et de la Chaux dans les tissus

Les méthodes que nous exposons sont toutes personnelles. Avant d'entrer dans leur description, nous parlerons des fixateurs employés afin de n'avoir plus à y revenir.

Nous avons utilisé presque toujours la formaldéhyde en solution étendue à 5, 10 ou 20 %.

En fixant de très petits morceaux le formol pénètre bien et, comme il s'agit de recherches microchimiques, il offre l'avantage de n'apporter aucune nouvelle cause d'erreur.

Nous avons écarté le Bouin, car le picrate de calcium est un peu soluble dans l'acide acétique étendu.

En principe d'ailleurs aucun liquide contenant un acide n'a été employé; nous avons gardé, après expérimentation et pour la recherche du phosphore seul, l'acide trichloracétique au tiers dans vingt volumes de formaldéhyde à 10 % additionné de 15 % de sel marin, et l'acide chromique en solution aqueuse à 5 %. La chaux se transforme en chromate, et le phosphore est déplacé pour la plus grande partie.

La légère solubilité du chromate de calcium fait qu'une partie de ce sel est enlevée dans les eaux de lavage;

Le déplacement du phosphore par le chrome n'étant pas total, la fraction du phosphore non transformé peut échapper aux investigations. La laque (1) double chrome-calcium, sur hématoxyline par exemple, est peu lisible parce que trop chargée;

Toutes ces raisons font que l'acide chromique doit être considéré comme un fixateur d'exception. Cependant, si on l'a employé, il vaut mieux se servir du chrome comme support de la laque et utiliser de préférence l'aurine tricarboxylée, ou violet au chrome de Geigy, qui donne une laque violette, pure comme nuance et solide à la lumière.

(1) On appelle laque la combinaison insoluble d'une matière colorante et d'un métal. On ne peut former des laques qu'avec des métaux au moins bivalents mais tous les métaux au moins bivalents peuvent former des laques, c'est ce qu'on exprime souvent par l'expression : tel colorant « tire ou monte sur tel mordant », c'est-à-dire que le colorant forme avec le mordant une laque insoluble.

Il faut que le mordant soit à l'état d'oxyde, ce qu'on réalise dans l'industrie de différentes façons, et c'est ce qu'on fait quand on vire la laque ferrique de l'hématoxyline dans l'eau de source, c'est-à-dire eau alcaline.

On peut donc « colorer sur mordant de chrome, de tungstène ou d'urane », tout réside dans le choix du mordant ou dans celui de la matière colorante.

Il ne faut pas oublier non plus que le sel employé comme mordant doit être soluble, mais aussi facilement dissociable, c'est-à-dire facilement décomposable en ses constituants, un acide et un oxyde métallique.

Après fixation au formol nous avons utilisé l'alcool, mais dans des conditions particulières que nous précisons :

Dans 100 centicubes d'alcool *anhydre* on verse quelques gouttes de glycérine aussi privée d'eau que possible, les pièces soigneusement déshydratées sont plongées dans ce mélange, peu à peu le phosphate acide de chaux s'éthérifie en glycérophosphate (1). La réaction dure deux mois environ pour de petites pièces. Elle nous a servi à étudier la marche du calcaire dans les tissus en voie de calcification.

Cette méthode montre beaucoup de détails nouveaux, il est bien probable toutefois qu'elle ne montre pas tous ceux que l'on pourrait voir si l'éthérification était complète : Il s'agit là d'une réaction reversible, avec formation d'eau, l'éthérification ne peut se faire qu'autant que l'eau est absorbée. Néanmoins la méthode est intéressante.

LA CHAUX

Les sels de chaux, très abondants dans certaines parties de l'organisme, sont bien connus déjà au point de vue de leur répartition topographique et de leur nature chimique.

Nous les avons étudiés d'abord dans l'hépato-

(1) Il est bon, si l'on craint une deshydratation insuffisante, de renouveler le liquide au bout de 24 heures, puis une seconde fois après 3 ou 4 jours. On a de la sorte une éthérification plus régulière qui s'active d'ailleurs facilement à l'étuve à 37°.

pancréas de l'escargot, aux diverses périodes de la vie de cet animal, et ensuite dans les tissus en voie de calcification chez des embryons de porc, de souris, de chien et de chat.

Les sels de chaux se présentent sous deux formes distinctes : phosphate et carbonate.

Les phosphates de chaux mono et bibasique, solubles, se transforment facilement en carbonate au contact de l'air et peut-être aussi au contact de l'acide carbonique du sang. Quoiqu'il en soit, chez l'embryon, le phosphate prédomine nettement, le carbonate apparaît en quantité plus considérable dans le dernier tiers de la gestation mais reste toujours inférieur comme quantité au phosphate.

Il y a au point de vue chimique trois phosphates de chaux : mono, bi et tri basique, et deux carbonates : carbonate acide, instable, carbonate neutre, stable et insoluble.

Comme le phosphate prédomine sur le carbonate, l'étude de la chaux doit toujours être complétée par la recherche qualitative et s'il se peut quantitative du phosphore sous la forme PO^4H^3.

Or l'étude comparée de ces deux corps montre que le phosphore paraît toujours être plus abondant que la chaux et que dans l'hépato-pancréas de l'escargot on doit compter surtout avec un phosphate de chaux, si l'on excepte l'oxalate de chaux qui nous a paru former la plus grande partie des cristaux calciques intracellulaires de l'escargot hibernant.

Les analyses de Hugounenecq, citées dans le traité

de chimie de Desgrez (1), montrent que le phosphate de chaux est au carbonate dans l'os embryonnaire comme 8 est à 1. L'erreur que nous ferons en nous occupant uniquement du phosphore fixé à la chaux ne sera donc pas très considérable chez un embryon jeune.

Comme d'autre part la proportion de phosphore contenue n'est pas en rapport, défalcation faite du carbonate, avec la quantité de chaux restante, il nous est permis de supposer que le phosphate de chaux en question n'est pas saturé mais est au contraire mono ou bibasique.

La remarque peut être généralisée et il semble bien résulter de nos recherches que le phosphate de chaux « en transit » est un phosphate mono ou bibasique. Le sel tribasique et le carbonate sont des sels fixés, sur la topographie desquels nous aurons à revenir.

La bibliographie de la question que nous traitons, très abondante au point de vue chimique pur, est beaucoup moins étendue en histo-chimie. Les recherches les plus anciennes ont été exposées dans les traités classiques, auxquels nous prions le lecteur de bien vouloir se reporter.

(1) Desgrez. *Chimie médicale.* Baillière, 1921, p. 187.

Méthodes de recherche

On peut les diviser en deux groupes :

a) Méthodes chimiques pures, s'appuyant sur la cristallographie, les solubilités spéciales, les précipités caractéristiques par leur forme ou leur solubilité;

b) Méthodes chimiques associées à une réaction d'une matière colorante, celle-ci produite in situ, ou apportée de l'extérieur toute préparée.

Cette seconde partie sera précédée de quelques remarques générales sur le choix à faire parmi les matières colorantes innombrables que nous offre l'industrie, sur les raisons qui doivent présider à ce choix, et de quelques notions chimiques très succinctes sur ces matières colorantes, notions destinées à montrer le rapport existant entre la structure et les propriétés, et cela dans l'espoir que ces quelques considérations attireront vers l'histo-chimie des chercheurs chaque jour plus nombreux.

METHODES CRISTALLOGRAPHIQUES OU CHIMIQUES PURES

Ces méthodes, en général très sensibles, sont basées

sur les caractères morphologiques, les conditions de formation ou de solubilité des cristaux obtenus, données auxquelles vient parfois s'ajouter la recherche de l'activité optique sur la lumière polarisée.

Le principe est très simple : Etant donné un acide (une base), trouver la base (l'acide) qui sera susceptible de former avec le corps à déterminer un sel cristallisable, facilement reconnaissable à ses caractères chimiques.

Nous passerons en revue, d'abord, les réactions qui ont pour but de produire des sels de chaux cristallisés et caractéristiques.

Oxalate de chaux. — Sensibilité 0,06 mgr. de Ca (Behrens et Kley) (1). L'oxalate de Ca précipite en petits cristaux de 4 à 6 μ des solutions d'acide oxalique additionnées d'acide acétique. Les cristaux sont plus volumineux, 12 à 20 μ, quand ils sont produits en présence d'acide nitrique libre.

L'acide borique, les chlorures d'aluminium, ferriques n'influent pas sur cette réaction.

L'oxalate de chaux formé est légèrement soluble dans l'eau (T. W. Richard, *Z. f. anorg. Ch.*, n° 28, 1901, p. 85), mais il est tout à fait insoluble en présence d'oxalate d'ammoniaque.

La précipitation et la cristallisation ne sont pas instantanées, les cristaux sont beaucoup plus volumineux à chaud qu'à froid. La réaction faite à l'aide

(1) Behrens et Kley. Microchemische Analyse, Vierte Auflage, 1 Teil, Verlag von L. Voss, Leipzig, 1921.

d'une solution d'oxalate d'ammonium peut présenter une cause d'erreur, le magnésium, en effet, se trouve dans certains oxalates commerciaux ou peut se trouver dans le tissu examiné, la solubilité de l'oxalate de Mg dans l'eau chaude empêche la confusion. Le dosage peut être fait par la méthode de Shedd (1).

Sulfate de chaux. — Sensibilité de 0,04 mgr. de Ca (Behrens et Kley). Le sulfate de chaux se présente sous forme de prismes mono-cliniques, de 15 à 90 μ, dont les faces sont inclinées à 65° formant une demi-pyramide; dans les cristaux isolés, l'angle au sommet est de 53°.

Ces cristaux se groupent très souvent en queue d'hirondelle et cette forme est si fréquente qu'on peut la considérer comme la forme caractéristique des cristaux de gypse.

Les formes en X sont plus rares.

Les acides forts gênent la réaction, les chlorures des métaux trivalents modifient la forme des cristaux.

Il se forme alors souvent, surtout en présence des acides forts, des éventails ou des bouquets de fines aiguilles.

L'addition d'acétate de soude ou d'ammoniaque à la solution, permet à la cristallisation de se continuer.

L'acide borique empêche la précipitation du sulfate, ne laissant cristalliser que l'oxalate et le carbonate.

(1) O. M. Shedd. *Soil. Soc.*, t. X, 1920, p. 1. Dosage de la chaux à l'état d'oxalate.

Tartrate de chaux. — Sensibilité 0,03 mgr. de Ca (Behrens et Kley). Par la transformation du sulfate en tartrate on possède un moyen de travail commode, en outre les difficultés de solubilisation du sulfate par la chaleur sont tournées par l'addition de carbonate de soude.

Le tartrate de soude précipite bien en présence d'acide acétique, plus lentement en présence d'acide sulfurique; l'addition d'alcool à l'essai chauffé, accélère la cristallisation.

Ce sel se présente sous forme de prismes rhombiques à 6 pans inclinés à 115° et aussi sous forme de cristaux à trois pans inclinés à 57°30.

Ces cristaux sont optiquement actifs.

Carbonate double de chaux et de sodium. — Ces cristaux portent le nom de Gay Lussite à l'état naturel; la réaction est lente et donne, après quelques minutes, de petits cristaux rhomboédriques de 5 à 10 μ. qui peuvent atteindre jusqu'à 25 μ.

L'aluminium, le chrome, le fer, l'acide borique sont sans effet sur cette réaction qui, par contre, est rendue inutilisable par le magnésium, le baryum, le strontium.

Ferrocyanure de potassium et de chaux. — Cristallisé en petites tablettes de 20 à 25 μ, la réaction est gênée par les sels de strontium.

Phosphate de chaux. — Réaction très lente, se fait par le phosphate d'ammoniaque en présence d'acide

acétique concentré, même quand il s'agit d'un précipité amorphe de phosphate de chaux; les cristaux se produisent également en laissant le contact se prolonger avec l'acide acétique fort. Les cristaux du fluosilicate (sel de Boricky) sont peu caractéristiques.

Dénigès a décrit la méthode à l'acide iodique (1). Cette méthode simple permet, par la forme des cristaux, de séparer strontium, baryum et calcium.

Toutes ces réactions sont trompeuses par leur apparente simplicité. Elles nécessitent beaucoup de soins, les causes d'erreur sont fréquentes, il faut être très au courant des procédés d'analyse qualitative pour les employer avec succès; d'autre part, les métaux sont dans les tissus à l'état de combinaisons organiques, complexes, il faut alors démasquer le métal avant de pouvoir en démontrer la présence. Enfin ces cristallisations peuvent très bien ne pas se faire in situ, plusieurs métaux peuvent précipiter ensemble, l'observation devient difficile; d'autres fois encore les réactifs nécessités sont dangereux pour les coupes, les abiment, les décollent (comme l'ammoniaque), et le classement chimique rigoureusement établi par les chimistes analytiques n'est pas applicable en tous points à l'histologie qui ne s'accommode pas de réactions brutales.

Voici, à titre documentaire, les caractères chimiques

(1) Denigès. *C. R.*, t. C, 1920, p. 996.
C. R. t. CLXXI, 1920, p. 633.

des sels de chaux dont il est question dans les réactions précédentes :

	SOLUBILITÉ DANS 100 PARTIES		SOLUBILITÉ SPÉCIALE
	Eau Froide	*Eau Bouillante*	
Phosphate mono-basique..	se décompose	se décompose	s. acides.
— bi-basique ...	peu soluble	se décompose	s. acides et acétate NH4
— tri-basique...	insoluble	insoluble	s. acides.
Carbonate de Ca	0,0018	0,C88	insoluble alcool.
Sulfate Ca	0,0205	0,2174	insoluble alcool.
Sulfate sodium et calcium.	peu soluble	se décompose	
Oxalate	insoluble	insoluble	

En principe, toutes ces réactions se font de la même façon : Un sel soluble de l'acide convenable est mis en contact avec la substance à caractériser et la solution est acidifiée par quelques gouttes d'acide acétique ou parfois sulfurique.

Ainsi : phosphate de soude ou d'ammonium en solution acidifiée au moment de l'emploi par quelques gouttes d'acide acétique, donnent le précipité caractéristique du phosphate de Ca.

Nous avons utilisé ces différentes méthodes, et nous avons remarqué que seules les méthodes à l'acide oxalique, sulfurique ou tartrique donnaient des résultats intéressants, le phosphate très précis est moins utilisable dans l'espèce car la chaux y est déjà pour la plus grande partie sous cette forme. La méthode à l'acide iodique réussit très bien.

Une méthode de coloration minérale est celle de l'acide permanganique employé en solution très étendue; le permanganate de potasse, acidifié par l'acide

acétique, donne des cristaux rougeâtres de permanganate de chaux mais toute la coupe prend une teinte brune fort peu plaisante à l'œil et d'une interprétation un peu difficile. Enfin, cette méthode n'est bonne que lorsque la chaux est déjà en quantité appréciable.

Le Phosphore.

Nous étudierons maintenant les réactions dans lesquelles la chaux intervient par l'acide auquel elle était fixée, et comme l'acide phosphorique paraît être celui qui est le plus souvent joint à la chaux, nous utiliserons des corps susceptibles de fournir des phosphates insolubles et des sels de chaux solubles, à moins que l'on ne puisse réaliser, ce qui est fréquent d'ailleurs, un sel double. Ayant d'autre part l'intention de colorer le nouveau sel obtenu, nous serons tenus d'observer les deux règles suivantes :

a) Le métal employé devra être au moins bivalent;

b) Le sel devra être facilement dissociable, aussi nous adresserons-nous de préférence aux acétates.

Les règles concernant les matières colorantes à employer feront l'objet du chapitre suivant.

Voici la liste des corps qui ont été utilisés et le mode d'emploi.

Aluminium. — Le phosphate d'aluminium est insoluble, traité par une solution aqueuse de chlorhydrate d'ammoniaque il se précipite à l'état d'alumine, laquelle est colorée électivement en rouge sang par le rouge Congo.

Le sulfate d'alumine pur, exempt de fer, forme avec la chaux un sulfate double insoluble qui se colore électivement en rouge vif (rouge d'Andrinople ou rouge turc) par l'alizarine, tandis que la laque d'aluminium seule se colore en rouge orangé; la plus petite trace de fer modifie cette teinte qui vire au violet.

On emploie une solution de sulfate d'aluminium à 2 % additionné d'acide sulfurique monohydraté. L'adjonction de l'acide sulfurique empêche le mordançage des parties non calcifiées, car seul le sulfate double d'aluminium et de chaux est insoluble dans l'acide sulfurique étendu.

La lecture est rendue ainsi plus facile par la disparition presque complète de la teinte orangée de l'alizarinate d'alumine. D'autre part, la constante de dissociation du sulfate de chaux s'élève dans l'acide sulfurique étendu, tout en restant bien entendu très faible. C'est une considération du même ordre qui nous a fait prendre l'alizarine sulfonique comme colorant à cause de son groupement sulfo.

Considération que l'expérience et les échecs répétés avec une solution d'alizarine non sulfonée (même dissoute dans un solvant spécial) ont montré être parfaitement justifiée.

Ammonium. — Lilienfeld et Monti emploient une solution de molybdate d'ammoniaque dans l'acide nitrique. Le phosphomolybdate d'ammoniaque se forme lentement à froid, plus vite à chaud, et est très soluble dans l'ammoniaque.

Argent. — Les sels d'argent ont été employés pour la recherche de la chaux sous forme de nitrate ou de nitrate ammoniacal.

L'argent est le réactif utilisé par Kossa, nous verrons plus loin ses résultats. La précipitation de l'argent, très rapide à chaud, plus lente à froid, a été attribuée d'abord à la chaux puis ensuite à l'acide phosphorique combiné à la chaux.

Le fait que les noyaux soient peu colorés et que la chaux au contraire soit figurée en noir (argent réduit) implique immédiatement la distinction entre l'acide phosphorique lié à un minéral et celui-ci lié à un radical quelconque organique.

L'étude du précipité est intéressante car elle fournit des éléments chimiques.

Le précipité se dissout dans l'eau ammoniacale mais il ne se dissout pas dans le chlorhydrate, le citrate, ou le carbonate d'ammoniaque.

Il paraît donc bien prouvé par les solubilités spéciales que l'on a affaire à du phosphate d'argent. Ce sel est jaune, le carbonate bien lavé est blanc. Ils sont tous les deux colorés en rouge par l'arséniate de soude, en rouge brique par l'acide chromique et le bichromate.

Quand nous examinerons plus tard les résultats topographiques de cette méthode, nous verrons que dans la lame osseuse, l'arête centrale est noire, la substance pré-osseuse jaune.

Cette différence d'aspect est si frappante, si nette

même sur des coupes très fines, qu'il ne saurait être question d'une explication physique.

Le nitrate d'argent réagissant sur du phosphate de chaux donne naissance par double décomposition à du nitrate de chaux soluble et à un précipité de phosphate d'argent qui se réduit plus tard. Or, si l'on fait la réaction dans l'obscurité, le résultat est exactement le même, l'action de la lumière n'est donc pas prépondérante, l'argent ne se réduit pas instantanément, sans se dissimuler cependant que cette réduction est très rapide. On devrait donc pouvoir observer une phase plus ou moins longue où la lamelle osseuse ne contiendrait que du phosphate d'argent jaune. Il n'en est rien, et ceci parce que la double décomposition se trouve rapidement en état d'équilibre. Cette réaction implique donc l'intervention de la chaux qui précipite de l'oxyde d'argent.

Comme le phénomène ne se présente pas dans la substance pré-osseuse où la coloration jaune est nette, il faut donc supposer que le phosphore de la substance pré-osseuse contient moins de chaux ou tout au moins une quantité beaucoup plus faible de chaux fixée, et cette constatation aura encore un autre intérêt quand nous la rapprocherons de celles que nous amènerons à faire les autres expériences.

Baryum. — Ce métal très proche du calcium, que nous étudierons, forme avec les acides des sels dont les caractéristiques chimiques sont presque identiques

à celles des sels correspondants du calcium Le phosphate tribasique et le carbonate sont insolubles.

Avec le phosphate monobasique de calcium on peut former un phosphate mixte de baryum et de calcium qui présente la particularité d'être à peu près insoluble dans l'acide acétique.

Ce phosphate double peut se combiner au sulfate d'alumine et permettre la coloration par l'alizarine sulfonique ou l'alizarinate d'ammoniaque.

La réaction se réalise d'une façon très pratique en utilisant une solution d'eau de baryte saturée, à laquelle on ajoute, pour 100 cm^3, 10 cm^3 d'une solution à 10 % de chlorure de baryum (1).

Ce réactif, appliqué à l'étude d'os très jeunes, nous a permis de montrer la forme figurée des sels acides de l'acide phosphorique dans la substance fondamentale du cartilage, figuration que montrait d'ailleurs déjà, sans en indiquer la nature chimique, la réaction à l'argent décrite par Kossa.

Ceci prouve encore que cette réaction de Kossa est, primitivement au moins, dûe à la précipitation du phosphate d'argent. Les grains que l'on peut voir dans le cartilage sont d'ailleurs colorés en jaune brunâtre et non en noir.

On peut encore déceler d'une façon très précise les phosphates en présence de baryte en modifiant le

(1) Bien entendu, cette réaction peut se faire avec l'eau de chaux et le chlorure de calcium dans les mêmes conditions et avec les mêmes doses. La coloration ultérieure du précipité se faisant dans l'un et l'autre cas par l'alizarine.

réactif de Denigès au molybdate de strychnine. La réaction est beaucoup plus sensible si le réactif est fraîchement préparé (double décomposition entre le molybdate d'ammoniaque et le sulfate de strychnine) (1).

Cobalt. — Phosphate et carbonate insolubles.

Étain. — Phosphate et carbonate insolubles, mais ces précipités présentent cette particularité intéressante de se colorer en bleu par l'acide tungstique.

La même réaction est positive aussi avec les sels de zinc. Nous n'y reviendrons pas.

Fer. — Phosphate et carbonate insolubles. Les réactions des sels de fer sont tellement variées, l'emploi de ces corps comme mordants tellement fréquent que nous devons nous y arrêter.

Réactions purement chimiques (c'est-à-dire sans intervention de matières colorantes) :

1° Réaction du bleu de Prusse avec ferro ou ferricyanure, suivant que le mordant était constitué par un sel ferreux ou ferrique.

2° Réaction du sulfocyanure d'ammonium. Beaucoup plus sensible et précise que la précédente, mais la coloration est soluble dans l'eau, il ne peut donc y avoir de lavage subséquent Passage dans l'alcool.

3° Réaction du triaminophénol. Coloration bleue; laque soluble dans l'eau au contact des sels de fer.

4° Acide picrique et acide oxypicrique. Soumis à

(1) Debourdeaux. *Bull. S. Pharmacol.*, XXVII, 1920, p. 70.

l'action du sulfate de fer ces deux corps donnent des réactions colorées, mais seulement en présence des sels de chaux :

L'acide picrique donne une coloration rouge sang;

L'acide oxypicrique une coloration verte.

5° La dibenzylidène-acétone donne avec les sels de fer une coloration rouge intense.

La même réaction ne se produit qu'avec les sels de mercure.

Ce sont évidemment les réactions du paragraphe 4, peu connues, qui présentent pour nous le plus d'intérêt.

L'acide oxypicrique ou trinitro-résorcine, résulte de l'action d'un mélange sulfonitrique avec la résorcine.

L'acide picrique, trinitrophénol, est assez connu pour que nous n'insistions pas.

Ces réactions se produisent d'une façon assez satisfaisante en présence d'une petite quantité d'acide nitrique étendu.

Les sels de fer démasqués par l'acide chlorhydrique et transformés s'il y a lieu en sels ferriques, donnent au contact d'une solution sulfurique (très étendue) de diphénylamine, une coloration bleue, caractéristique en présence de nitrates (1).

Manganèse. — Le phosphate de manganèse est insoluble, et son emploi n'aurait pas de raison d'être

(1) Haün. Zeitsch. nahr Genüsmitt, t. XXXI, 1920, p. 355.
E.-M. Harvey. *J. americ. Chem. Soc.*, t. XLII, 1920, p. 1245.

s'il n'était possible de le caractériser ensuite par la réaction suivante :

La benzidine en solution acétique (comme les autres composés diphényliques) donne une coloration bleue intense avec les composés manganiques. La même réaction est positive avec les sels cériques, thalliques et cobaltiques (1).

Magnésium. — Ce corps est utilisé à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien. Nous rappelons seulement que la réussite de l'opération nécessite une assez grande quantité de solution, et la bonne cristallisation une quantité suffisante d'ammoniaque. Ce dernier point est très important car l'ammoniaque décolle les coupes collées à l'albumine et il en faut cependant un léger excès.

Le magnésium peut être décelé d'une façon plus pratique par la réaction d'Eisenlohr.

Il donne une coloration bleue avec la teinture alcoolique d'orcanette. Les colorations analogues données par le strontium et le manganèse sont distinguées par leurs teintes respectives après acidification (2).

Le *mercure* et le *nickel* donnent des phosphates et carbonates insolubles, la réaction n'ayant pas par elle-même un très grand intérêt.

Nous avons essayé avec succès un certain nombre

(1) Feigl. *Chem. Zeit.*, t. XLIV, 1920, p. 689. — Feigl. *Œstern Chem. Zeit.*, t. XXII, p. 124.

(2) Eisenlohr. Ber, t. LIII (B), 1920, p. 1476.

de métaux rares qui donnent avec l'acide phosphorique des sels complexes dont les caractéristiques de solubilité sont bien connues et dont l'usage est courant en chimie analytique. Ce sont : le molybdène, le tungstène, l'urane, et un autre corps : le vanadium, qui, dans la classification périodique des éléments, se range près du phosphore. Ses acides et ses sels ont par conséquent une très grande analogie avec les acides phosphoriques.

Molybdène, tungstène, urane. — Les poids atomiques respectifs de ces corps sont 96, 184, 238,5. L'intensité de leurs laques va décroissant, vérifiant à nouveau un phénomène que nous avions déjà remarqué : Avec un même colorant, l'intensité d'une laque est en raison inverse du poids atomique du métal employé comme mordant (la rapidité du mordançage est de même en raison inverse du poids atomique).

Le fait se vérifie pour le chrome (52,1), le calcium (40,09), le baryum (137-37) (1).

Le molybdène a été utilisé comme mordant à l'état d'acide phosphomolybdique joint à l'hématoxyline, mais nous n'avons pas connaissance d'un cas où il ait été employé comme suit.

Le molybdène et le tungstène seront utilisés à l'état d'acide molybdique et tungstique combinés à l'ammoniaque.

(1) Le vanadium, que nous étudierons ensuite, a un poids atomique de 51,2.

La solution peut se préparer de la façon suivante :

Acide molybdique (ou tungstique) : 0,25

Ammoniaque : goutte à goutte jusqu'à dissolution.

Ajouter quelques centimètres cubes d'eau, puis :

Nitrate d'ammoniaque ..... 4 gr.

Eau distillée, q. s. pour ..... 50 cm³

Aciduler ensuite la solution par 2 cm³ d'acide nitrique, la réaction acide doit être très nette.

Cette solution s'emploie à chaud, le mordançage doit durer 1 minute environ avec le molybdène, 3 à 4 minutes avec le tungstène.

Coloration à l'hématoxyline, durée égale à celle du mordançage.

Différenciation dans la solution suivante :

Acide nitrique pur ..... 1 cm³

Eau ..... 30 cm³

puis coloration de fond dans l'éosine acétifiée par quelques gouttes d'acide acétique.

N. B. — La double coloration n'est pas très heureuse avec le molybdène, elle réussit mieux avec les autres corps.

Deshydrater, xylol, baume. Les parties phosphorées sont bleu intense avec le molybdène, bleu clair avec le tungstène. Même après une action rapide et en solution étendue le molybdate donne une laque épaisse très peu appropriée à l'étude des détails fins, mais qui fournit une vue d'ensemble très caractéristique. Le tungstate réagit plus lentement mais si on mordance trop longtemps la laque perd sa finesse.

Ces deux laques ne se démontent pas dans l'acide nitrique étendu (cela d'ailleurs est évident, l'acide nitrique ne pouvant que précipiter plus complètement l'acide phosphotungstique ou phosphomolybdique).

La coloration complémentaire à l'éosine acétique ne réussit pas bien avec le molybdate, mais est très acceptable avec le tungstate (éosine et acide molybdique forment un précipité rouge insoluble dans l'eau et soluble dans les alcalis (méthode de Mann au bleu de méthyle-éosine).

La réaction de Mac Callum emploie également l'acide molybdique réduit ensuite par le chlorhydrate de phénylhydrazine. Nous l'avons faite, elle nous a donné des résultats toujours plus étendus que n'importe quelle autre méthode; l'acide molybdique a des affinités telles pour les tissus, que nous nous sommes demandé s'il ne se formait pas un autre composé insoluble que le phospho-molybdate.

Réaction au molybdate (Woy).

Cette réaction n'est bien entendu applicable que si l'on a transformé le sel de l'acide phosphorique en sel d'ammonium.

Pour utiliser cette réaction en histologie, il faudra la modifier ainsi que nous le verrons au chapitre des métaux rares.

1° Une solution à 3 % de molybdate d'ammoniaque. Si l'on veut une solution titrée, dissoudre 120 gr. de molybdate d'ammoniaque du commerce dans 4 litres

d'eau, 1 centicube de cette solution précipite 0,001 mgr. d'anhydride phosphorique.

2° Une solution de nitrate d'ammoniaque obtenue en dissolvant 340 gr. de sel cristallisé dans un litre d'eau.

3° Acide nitrique de poids spécifique 1,153.

4° Eau de lavage contenant : 200 gr. de nitrate d'ammoniaque, 160 cm^3 d'acide nitrique dans 4 litres d'eau.

La solution doit se faire à chaud. La précipitation du phosphomolybdate jaune est alors quantitative (1). Nous reviendrons un peu plus loin sur un procédé dérivé de celui-ci.

Uranium. — Ce métal a retenu plus longtemps notre attention, son phosphate assez fortement coloré en jaune présente une solubilité très grande dans les acides minéraux, mais est totalement insoluble dans l'acide acétique glacial, même à chaud.

Ce caractère, qui le rapprochait des phosphomolybdates et des phosphotungstates, le désignait donc en première ligne. L'urane a été depuis longtemps employé pour doser les acides phosphoriques; il est de plus polyvalent, il pourra donc, avec un colorant choisi, former une laque.

(1) Cette réaction est gênée par la présence d'acide tartrique et oxalique (Hundesagen. *Zeit für Anal. chem.*, XXVII, p. 164. — Eggez. *J. f. p. ch.*, LXXIX, p. 496). Au contraire, H. de Jüptner, recommande d'ajouter de l'acide tartrique quand on cherche le phosphore en présence de fer (*Z. für Berg an Hutten*, p. 471, 1894).

L'uranium, par certaines de ses qualités, se présentait donc comme un mordant parfait.

La précipitation du phosphate d'urane se fait très bien en milieu acétique; d'autre part, on peut évaluer colorimétriquement la quantité d'urane précipité par l'intermédiaire de la coloration rouge que donnent les sels d'uranyle avec le salicylate de soude (1).

Des données ci-dessus découle immédiatement la composition de la solution à employer comme réactif et les conditions de l'expérience. D'autre part, la faible nocivité de l'acide acétique étendu, à chaud, sur les coupes, permet de précipiter le phosphate d'urane à l'étuve, la réaction est plus rapide, plus intense et plus démonstrative. L'urane est vraiment le mordant de choix pour les noyaux. S'il montre les mêmes détails que les deux corps précédents, leur définition est beaucoup plus nette. Par sa puissance et la finesse de ses images il s'apparente au vanadium.

La réaction des sels d'uranium étant complétée par une coloration à l'hématoxyline, nous réservons au chapitre suivant l'exposé détaillé de la méthode.

Vanadium. — Ce corps fournit des acides absolument homologues des acides phosphoriques et la réaction suivante pourrait être interprétée comme une réaction de substitution.

Déplaçant l'acide phosphorique pour former avec le radical un vanadate où le vanadium vient, dans la coloration ultérieure, s'adjoindre au radical (chaux

(1) Müller. *Chem. Zeit.*, t. XLIII, 1919, p. 739.

dans le cas visé ici), la remarque que nous avons faite tout à l'heure (l'intensité d'une coloration est en raison inverse du poids atomique du mordant) trouve ici une confirmation nouvelle. Le vanadium a un poids atomique faible, la chaux également, l'addition de ces deux poids atomiques nous amène au voisinage de la moitié de celui du tungstène. et, en effet, la réaction est intermédiaire comme intensité entre celle du molybdène et celle du tungstène, mais plus voisine de la première que de la seconde.

Le vanadium s'emploie de la même façon que le tungstène, il faut calquer également les formules et les modes d'emploi.

Comme les laques du molybdate et du tungstate, celle du vanadate résiste à l'acide nitrique étendu.

Les résultats obtenus avec ces différents corps sont, dans l'ensemble et à première vue, assez comparables, cependant ceux du vanadium présentent encore sur ceux de l'urane des avantages indiscutables.

Nous ne savons à quelle cause les attribuer, mais si l'on se souvient que les vanadates sont des catalyseurs énergiques et de puissants véhicules de l'oxygène, on peut se demander si l'action substitutive exercée ne serait pas dûe à ce pouvoir oxydant énergique.

Ou bien, et cette dernière hypothèse rentre tout à fait dans le cadre des résultats déjà acquis, l'acide vanadique (acide faible) déplace l'acide phosphorique et ceci ne peut être compris, en se reportant aux constantes de dissociation des phosphates, que si l'on admet que les phosphates visés sont acides, spécialement

les phosphates monobasiques qui sont décomposés si facilement.

Quand nous traiterons du choix du colorant, nous reviendrons sur certaines particularités chimiques intéressantes.

Potassium. — Nous voudrions terminer cette revue, qui a pu paraître fastidieuse, par des renseignements sur un métal, peu fréquent c'est vrai, mais difficile à déceler. Nous voulons parler du potassium (la grande solubilité de ses sels est l'obstacle).

Pour le précipiter, il faut avoir recours aux perchlorates, à l'acide perchlorique ou mieux au perchlorate d'aniline (1-2-3-4). On peut encore le précipiter à l'état de cobaltrinitrite de potassium (5). Mais la méthode de choix paraît être celle qui est basée sur l'emploi du thiosulfate double de sodium et de bismuth dont la sensibilité est égale à 1/57.000 (6).

La présence du bismuth permet de faire ensuite une coloration élective à l'orcéine dont on connaît l'affinité pour les sels de bismuth.

(1) R. L. Morris. *Analyst,* t. XLV, 1920, p. 349.

(2) G. P. Baxter et Kobayashi. *J. Amer. Chem. Soc.,* t. XXXIX, 1917, p. 249.

(3) G. P. Baxter et Kobayashi. *J. Amer. Chem. Soc.,* t. XLII, 1920, p. 735.

(4) A. B. Kuzirian. *Proc. Iowa Acad. Sc.,* t. XXIV, 1917, p. 547.

(5) P. Wenger et C. Hémen. *Ann. Chim. anal.,* t. II, 1920, p. 198.

(6) Lutz. *Zeitschr. Anal. Chem.,* t. LIX, 1920, p. 145.

LES MATIÈRES COLORANTES APPLIQUEES A LA RECHERCHE DE LA CHAUX

Qu'il s'agisse de couleurs directes ou de couleurs à mordants, nous aurons toujours affaire à des couleurs acides (sauf une exception signalée plus loin).

Nous ne rappellerons les caractères ou constitutions chimiques que lorsque ce sera indispensable à la compréhension de notre exposé.

A) Couleurs directes

Ces couleurs acides sont généralement combinées à du sodium qui les solubilise; la combinaison est détruite par les acides minéraux forts.

L'éosine donne ainsi un précipité rose, qui, dissous dans l'alcool additionné de son volume d'eau, colore d'une façon assez intense les tissus ou cellules chargés de sels minéraux, mais l'uniformité de teintes des divers sels de l'éosine empêche une interprétation facile et l'on doit compléter cette coloration. On peut le faire de plusieurs façons.

Une solution hydroalcoolique de bleu de méthylène se recombine facilement in situ à l'éosine, pourvu que celle-ci soit elle-même liée à un radical monovalent, laissant par conséquent colorées en rose vif les parties calcifiées. La même coloration peut être effectuée avec du bleu polychrome étendu.

La méthode la plus simple est celle qui consiste à

recolorer au moyen d'un éosinate, à condition que celui-ci ne soit pas en solution alcoolique mais une solution alcoolo-glycérinée (1).

La coloration se fait comme si la coupe n'avait pas été colorée auparavant; les résultats ont été exposés dans un note au Congrès des Anatomistes à Gand, nous n'y reviendrons pas.

En principe, tous les colorants acides peuvent servir au même usage. Nous pensons qu'il y a certainement parmi eux un ou plusieurs réactifs intéressants.

Nous rappelons l'exemple, plus haut signalé, du rouge Congo qui colore électivement l'alumine précipité.

A cette règle d'emploi exclusif du colorant acide, nous ne voyons qu'une seule exception, c'est-à-dire un cas où un colorant basique puisse être employé : c'est le cas d'os soumis à la décalcification par l'acide nitrique étendu.

L'action chimique de l'acide nitrique est une solubilisation de la chaux sous forme de nitrate de calcium, et, si dans cette réaction l'acide carbonique est éliminé, l'acide phosphorique reste fixé au tissu primitivement chargé de phosphate de chaux.

La preuve de cette réaction est donnée par la persistance du précipité de phosphate d'urane, la contre-preuve par la possibilité de fixer sur lame, de la chaux ou la baryte, par l'intermédiaire d'eau de chaux ou

(1) Rentrent dans cette catégorie : colorant de Giemsa, panchrome de Pappeinheim, histopolyéosinate Roche.

de baryte additionnée de $CaCl^2$ ou de $BaCl^2$ à 10 %. On peut effectuer ensuite les colorations particulières.

Dans ce cas, donc on peut utiliser un colorant basique et on ne doit employer bien entendu que la base de ce colorant.

La base de la Rosaniline simple ou triphénylée donne naissance, au contact de l'acide phosphorique libéré par la décalcification, à un colorant soluble de teinte assez vigoureuse pour qu'une décoloration totale ne soit pas à craindre lors des manipulations.

On peut, bien entendu, dans le même cas, employer un colorant acide qui, théoriquement, devrait être précipité là où il y a de l'acide libre. L'expérience nous a montré que cette précipitation se faisait d'une façon tellement irrégulière que l'interprétation prêtait à toutes sortes de fantaisies.

En somme, il y a peu de chose à attendre des couleurs directes, tout au moins employées comme nous l'avons fait (si nous exceptons les recolorations par les éosinates).

B) Couleurs a mordants

C'est donc aux couleurs à mordants que nous aurons recours, grâce à la solidité et à l'électivité des laques qu'elles forment.

Presque toutes sont des couleurs dérivées de l'anthracène ou mieux de l'anthraquinone. La plupart d'entre elles sont actuellement préparées par synthèse, cependant pour rappeler leur origine primitive et les

opposer aux couleurs précédentes, nous les grouperons sous le nom de matières colorantes *naturelles* dont nous ferons deux classes : celles dont la structure est connue, celles dont elle est inconnue. Nous éliminerons d'abord ces dernières.

Matières colorantes des baies de sureau, de troène, de mûres et de myrtilles.

Ces matières s'extraient facilement par la macération des baies dans l'eau acidulée par HCl SO^4H^2 ou des acides organiques, acétique, citrique, oxalique, tartrique; ces derniers sont préférables.

Baies	30 gr.
Acide oxalique	10 gr.
Eau	100 gr.

Faire bouillir une heure en remplaçant l'eau à mesure qu'elle s'évapore.

Coloration pendant 24 ou 48 heures, lavage à l'eau de source, deshydrater, xylol, baume.

D'une façon générale toutes ces matières colorantes sont des colorants anthraquinoniques tirant sur mordant; cependant, par certains caractères, plusieurs se rapprochent des dérivés des xanthones.

On peut obtenir les dérivé tartriques et oxaliques de ces produits sous forme de minces cristaux enchevêtrés, à condition de dessécher les solutions concentrées, dans le vide à une température inférieure à 40°.

Les matières colorantes extraites de ces divers fruits donnent toutes une réaction comparable comme cou-

leur, la coloration de la chaux varie entre le bleu verdâtre et le vert franc. La réaction des baies de sureau est la plus intense et peut être complétée par une coloration des noyaux au moyen d'une solution de perchlorure ou de sulfate ferrique.

La matière colorante extraite des myrtilles fait exception, d'abord elle doit être extraite par macération à froid sans l'adjonction d'aucun acide, de plus elle colore les tissus calcifiés d'une façon assez remarquable en rose vif, alors que le reste de la coupe est presque incolore.

Cette réaction rapproche cette matière colorante de l'acide carminique et kermessique.

Les matières tannantes.

Il existe tout un groupe de produits qui ne sont pas à proprement parler des matières colorantes, au sens où l'entendent généralement les histologistes, mais qui, par leur nature probablement anthraquinonique et en tous cas par la présence de deux groupements OH en ortho dans le même noyau, tirent sur mordants. Ces matières ont un usage industriel et leur réaction à l'eau de chaux est un des procédés qui permettent de les classer : ce sont des matières tannantes.

Disons tout d'abord que tous ces produits naturels tirent sur alun de fer en noir verdâtre ou noir bleuâtre suivant qu'il s'agit de corps contenant le groupe catéchique $C^6 H^4 (OH)^2$ 1-2 pur ou mélangé.

Voici une liste de ceux qui sont le plus utilisés ou dont les laques sont le plus caractéristiques.

Ce tableau n'est qu'une réduction de celui établi par Procter pour classer les matières utilisées pour la tannerie.

Nous donnerons uniquement le nom du corps et la couleur de la laque qu'il forme avec l'eau de chaux. Ces solutions doivent être préparées à l'avance et mûries comme une hématoxyline. Etant fortement réducteurs ces corps absorbent l'oxygène de l'air et l'oxydation spontanée est suffisante. Ces solutions s'emploient de préférence à chaud, les réactions sont lentes à se produire et ne donnent pas à l'œil les magnifiques résultats de la chimie analytique.

Nous pensons qu'il y aurait intérêt à reprendre ces recherches de façon systématique.

Quercitron (1)	Brun rougeâtre.
Chêne châtaignier	id.
Dividivi (cœsalpina coriaria)	Jaune tournant au pourpre.
Valonea (enveloppe du gland duquercus argilops)	id.
Extrait de bois de chêne	id.
Algarobo (Ecales du prosopopis dulcis)..	Jaune tournant au noir.
Ecorce d'acacia Catéchu.....	Rose chair.
Extrait d'écorce de manglier.....	Rouge.
Quebracho	Brun léger.

(1) L'extrait de ce bois teignant en jaune les mordants d'alumine, teint en orangé brunâtre les combinaisons alumine-chaux et permet de faire ainsi un partage de ce qui revient à l'une ou à l'autre des bases. Nous ferons une remarque analogue avec l'alizarine.

Bois de cachou (acacia catéchu).....	Rouge (lent à se former).
Ecorce de mélèze (Larix europea).....	Brun rouille.
Ecorce de Hemlock	Rouge brun.
Extrait de mélèze	Précipité brun.

Nota. — Dans tous ces cas il s'agit d'une laque (combinaison de la chaux avec le réactif employé).

Tous ces extraits ont été gracieusement mis à notre disposition par la Compagnie des Extraits Tannants, qui, avec une extrême obligeance, nous a fourni les sources bibliographiques nécessaires. Nous sommes heureux de pouvoir la remercier à nouveau ici.

Les matières colorantes de constitution connue.

Le carmin (acide carminique), le kermès (acide kermessique) sont des matières colorantes rouges dont la constitution est maintenant à peu près établie et qui se rattachent au groupement anthraquinonique (1).

La structure chimique explique seule l'analogie des images que donnent ces deux réactifs. Nous verrons plus loin que la purpurine (dérivé de l'alizarine) présente avec ce colorant des rapports aussi étroits que ceux qu'on peut établir entre le carmin et le kermès.

Ces deux couleurs donnent des laques faibles et les colorations pour être belles doivent être très prolongées (6, 8, 10 et même 15 jours).

Nous avons utilisé une solution de carmin aluné.

(1) Dimroth, Kammerer et Friedemann.

Carmin	ââ 3 gr.
Alun de potasse	ââ 3 gr.
Eau distillée	100 gr.

Filtrer après 24 heures d'étuve à 55°.

Coloration très prolongée pendant 4 à 5 jours (peut durer de 14 à 15 jours sans craindre de surcoloration), différencier à l'alcool, laver à l'alcool-acide, deshydrater, xylol, baume.

Le carmin présente vis à vis de la chaux une réaction curieuse, il ne colore pas la chaux directement, mais seulement à la faveur de l'alun. Il semble que ce soit là une réaction comparable à celle de l'alizarine; de plus, il colore les tissus calcifiés plus faiblement que la substance pré-osseuse (1) et, d'après les remarques pratiques que nous exposerons plus loin, il semble bien que cette action élective doive être attribuée à la fixation d'alumine.

En second lieu, le carmin qui colore la chaux en rose colore la baryte en rose violacé et si la réaction a été faite à une température de 70 ou 75° en bleu pâle. Mais cette réaction n'est pas stable, elle ne tient pas en particulier devant l'alcool.

Le carmin et ses dérivés n'ont pas cette franche électivité que nous trouverons dans d'autres matières colorantes naturelles. C'est pourquoi ces réactifs sont peu utilisés.

(1) Retterer, Tourneux.

L'alizarine.

Bien qu'actuellement l'alizarine naturelle ait complètement disparu du commerce, nous gardons cette matière colorante dans la classe des couleurs naturelles.

Les Chinois, puis Duhamel (1739) avaient remarqué la coloration élective de l'os en incorporant de la garance à la nourriture donnée à des animaux; mais il faut arriver aux temps modernes pour voir l'alizarine devenir un réactif de la chaux et cela grâce à une recherche industrielle.

Cherchant à réaliser la teinture en rouge turc, que personne n'arrivait à faire aussi bien qu'à Andrinople, un chimiste suisse s'avisa d'aller en Turquie voir sur place les procédés de teinture. Il s'aperçut que l'on donnait une importance extrême à l'eau employée et, par un prélèvement habile, pût déterminer la nature de cette eau. Elle était légèrement séléniteuse et c'est ainsi que fût découverte l'action de la chaux qui seule donnait au rouge d'alizarine son éclat particulier.

(La baryte donne un rouge plus violet).

Nous donnerons sur l'alizarine quelques détails chimiques et surtout sur les diverses oxyanthraquinones qui peuvent s'y trouver mélangées et qui viennent troubler la netteté de la réaction.

Nous avons employé pour ces réactions uniquement l'alizarine sulfonique, ou sulfo-conjuguée, ou encore sulfo-alizarine qu'on prépare en traitant l'alizarine

par de l'oléum à 60 %, c'est-à-dire acide sulfurique contenant 60 % d'anhydride sulfurique libre.

L'alizarine est une dioxyanthraquinone 1, 2 de beaucoup la plus importante des dioxyanthraquinones isomères.

Elle donne, avec tous les mordants métalliques, des laques colorées, mais dans la recherche qui nous intéresse, seule, la laque d'alumine est utilisée. Il va sans dire que le calcium, métal bivalent, peut servir seul de support à la laque. Elle ne se produit que dans certaines conditions qu'il importe de bien préciser.

Les solutions alcalines d'alizarine sont bleu violet et colorent en bleu la chaux et la baryte, mais la réaction histologique n'est pas constante, pas régulière, elle se fait souvent de façon brutale, la partie colorée l'est alors tellement que la lecture devient impossible avec un fort grossissement.

Pour obtenir une laque convenable pour l'étude, l'expérience nous a montré que la meilleure façon de procéder était de traiter l'alizarine par une solution de sesqui-carbonate d'ammoniaque. Il faut deux molécules de sel pour une d'alizarine.

On verse sur la lame, maintenue sur la platine chauffante, une quantité de solution suffisante pour la recouvrir entièrement. On chauffe jusqu'à émission de vapeurs, à ce moment le carbonate d'ammoniaque se dissocie suffisamment : 1° pour mobiliser et démasquer la chaux par son acide carbonique; 2° pour la fixer par son ammoniaque.

Cette méthode donne des résultats intéressants pour l'étude de la chaux dans l'os très jeune.

Quand on fait cette réaction, on remarque qu'au bout de quelques instants la teinte de la solution d'alizarine devient de moins en moins foncée, une teinte rose clair annonce la fin de la transformation (1). Pour éviter les surcolorations, il est nécessaire d'opérer en solution étendue.

La laque de chaux est violet rouge et la laque après mordançage à l'alumine rouge franc. Comme nous faisons appel à un sel de l'alizarine, il est bien évident que la laque double (alumine + chaux) sera moins nette et moins agréable à l'œil que celle que donne directement l'alizarine sulfonique.

La méthode offre le gros avantage d'être très rapide, le réactif n'altère pas les coupes et la différenciation à l'alcool donne à l'image toute sa netteté.

Procédés employant un sel d'alumine.

On utilise dans l'industrie l'acétate d'alumine car, après mordançage et teinture, le mordant est facilement décomposé, par la vapeur surchauffée, en alumine insoluble et acide acétique. On avive ensuite en sulforicinate alcalin.

(1) Si on laisse les lames trop longtemps sur la platine, la solution d'alizarine devient jaune pâle, en même temps une partie du colorant précipite et il est assez difficile ensuite de s'en débarrasser. La couleur jaune indique d'ailleurs la destruction complète de l'alizarinate d'ammoniaque.

Nous avons appliqué ce procédé à l'histologie (1), et nous donnons ci-dessous la technique la plus simple.

Préparer les solutions suivantes :

a)	Sulforicinate de soude	40 cm³
	Eau distillée	200 cm³
b)	Sulfate d'alumine	5 gr.
	Acide sulfurique à 66° B°.....	1 cm³
	Eau, q. s. p.	200 cm³

Il faut veiller avec grand soin à la pureté du sulfate d'alumine et spécialement de l'acide sulfurique. Une trace de fer, par exemple, fait virer la laque au violet et l'épaissit considérablement.

Quand la dissolution est complète, mélanger les deux liquides, laisser reposer 48 heures et filtrer.

Mordancer les coupes pendant 24 heures dans ce réactif, laver, puis colorer dans une solution à 0,25 d'alizarine sulfonique pendant 24 heures.

Laver à l'eau alcaline pour précipiter la laque, différencier dans le sulforicinate si l'on veut avoir des couleurs très vives.

Laver à l'eau, laver à l'alcool pendant 10 à 15 minutes, xylol, baume. Les parties calcifiées sont colorées en rouge, le reste de la coupe en jaune pâle. Il se forme là un sulforcinate d'alumine et de chaux. On peut reprocher au sulforcinate d'épaissir un peu la laque, mais pour les recherches topographiques le procédé est parfait.

(1) Congrès international des Anatomistes de langue française, Gand 1922.

Pour étudier les détails plus fins, il faut opérer d'une autre façon; les résultats, moins brillants peut-être à première vue, montrent à l'immersion une netteté parfaite.

Les coupes sont mordancées pendant 24 heures dans la solution suivante :

Sulfate d'alumine pur	7 gr.50
Acide sulfurique à 66° Bé (pur).	5 cm³
Eau, q. s. p.	500 cm³

Laver longuement à l'eau de source, car le sulfate double d'alumine et de chaux est insoluble ou à peu près, puis colorer pendant 24 heures dans une solution à 0,50 % d'alizarine sulfonique; laver à l'eau de source pour précipiter la laque formée et l'aviver.

Les parties calcifiées sont colorées en rouge vif, le reste de la coupe en orangé.

Colorations combinées : on choisit de préférence des couleurs bleues.

Rationnellement il fallait s'adresser à des couleurs ne gênant point l'action de l'alizarine et ne chevauchant point sur elle.

Après expériences, nous avons retenu trois bleus :

Le bleu coton C⁴B Poirier, bleu trisulfoné. Cette couleur est bleu violet en solution sulfurique, bleu verdâtre en solution nitrique, vert franc en solution phosporique. Traitée par les alcalis elle devient rouge, et bleuit de nouveau par l'acide sulfurique.

C'est une couleur à fonctions multiples; acide par ses trois groupes sulfo, elle peut par l'intermédiaire

de ces trois groupements se lier avec des métaux, c'est ici un inconvénient; par sa structure même, elle est indifférente, et se fixe aussi bien sur le protoplasma que sur le noyau.

Les remarques qui précèdent expliquent la technique obligatoire ci-dessous.

La coupe, lavée à l'eau, est plongée dans une solution de B. Coton à 1 % pendant 24 heures, la coupe au sortir de ce bain est surcolorée, on la lave à plusieurs reprises avec de l'eau de source à 55°-60°. Quand la différenciation est très marquée, c'est-à-dire que la couleur paraît presque disparue, on plonge dans la solution d'alumine précédente, dont l'acidité sulfurique fait instantanément reparaître la couleur, et décape les parties bleues sur lesquelles l'alumine veut se fixer (1).

Technique identique à la précédente à partir de ce moment (2).

Dans un second groupe d'essais nous avons fait appel à un colorant basique, le bleu de méthylène,

(1) Toutes les fixations sont bonnes pourvu que le liquide ne contienne aucun acide susceptible de former un sel de chaux soluble (acide acétique, nitrique). Les fixations au chrome donnent pour la chaux des résultats satisfaisants, car on peut ajouter au fixateur un peu d'acide sulfurique sans inconvénient.

(2) Une variante intéressante est la suivante : on dissout le bleu coton dans la solution d'alumine, à la dose de 0,10 à 0,15 ctgr. de couleur pure pour 100 cm^3 de solution d'alumine. Mordançage et coloration pendant 24 heures. Mais la solution ne se conserve pas bien.

que nous avons utilisé sous deux formes, pur ou mélangé avec ses dérivés d'oxydation à l'état de bleu polychrome.

Il faut alors procéder d'une façon tout à fait différente, le colorant basique surchargerait rapidement et d'une façon stable, il faut donc l'utiliser en solution très diluée et ne pas prolonger le contact.

Mordançage et coloration se font comme précédemment, puis, après précipitation de la laque, on colore pendant 1 à 2 minutes dans une solution à 0,25 % de bleu de méthylène, ou de bleu polychrome étendu de son volume d'eau.

Différenciation à l'alcool (1), xylol, baume.

Le bleu polychrome présente sur le bleu de méthylène un avantage extrêmement appréciable, puisqu'il colore électivement par ses thiazones la substance fondamentale du cartilage, aussi une préparation réussie permet-elle de suivre de façon extrêmement précise la marche du calcaire.

Pour l'étude de la zone d'ossification, ce sera donc la coloration type.

Si l'on a soin d'employer des bleus polychromes très riches en thiazones (violet de méthylène et dérivés), la différenciation et la deshydratation à l'alcool

(1) Nous n'avons pa sétudié l'action de la Glycerinæthermischüng de Unna, car le bleu polychrome que nous utilisons, très riche en thiazones, résiste très bien à l'alcool, même aiguisé d'une trace d'acide acétique, ou mieux d'un cristal d'anhydride phosphorique. Ces procédés nous ont donné toute satisfaction.

absolu n'altèrent pas la coloration violette métachromatique du cartilage.

On a même intérêt à colorer avec du violet de méthylène presque pur, de cette façon aucune surcharge n'est à craindre sur l'alizarine. Nous insistons très volontiers sur ce procédé qui est vraiment excellent, donne des figures très fines et des colorations solides.

Tels sont les modes d'emploi que nous avons utilisés et la matière colorante dont nous nous sommes servi. Nous donnons nettement la préférence à l'alizarine sulfonique sur les autres dioxyanthraquinones isomères, et sur les polyoxyanthraquinones.

La plus importante de ces polyoxyanthraquinones est la purpurine. On a décrit une méthode à la purpurine, à laquelle on peut faire d'emblée un reproche d'ordre purement chimique : la purpurine est la trioxyanthraquinone 1.2.4. (désignant la position des hydroxyles), elle résulte de l'oxydation de l'alizarine, et le commerce ne livre jamais sous le nom de purpurine de la garance, la trioxyanthraquinone 1.2.4, mais bien un mélange où elle prédomine souvent et où l'on trouve :

L'anthragallol	1.2.3.
L'isopurpurine	1.2.7.
La flavopurpurine	1.2.6.
L'oxychrysazine	1 2.8.
L'oxyanthrarufine	1.2.5.

La flavopurpurine étant la plus fréquemment rencontrée, le dérivé sulfuré (c'est-à-dire solubilisé par

un groupement SO^3H) de ce corps porte le nom de rouge d'alizarine 3.S.

Cela explique les extrêmes variétés de nuances que l'on obtient avec la purpurine, remarquons en outre que la flavopurpurine a une affinité toute particulière pour la substance fondamentale du cartilage. Cette affinité ne reçoit pas du simple examen de la formule chimique une explication suffisante; d'autre part, la même couleur, préalablement nitrée, garde encore cette affinité qui ne disparaît qu'après éthérification du troisième hydroxyle.

La purpurine est très soluble dans l'eau, l'alcool, elle ne résiste à aucun acide, il faut donc surcolorer très fortement, enfin ses laques ne sont pas très solides à la lumière.

Ces réserves faites, elle s'emploie comme l'alizarine.

RECHERCHE DU PHOSPHORE

Parmi les colorants à appliquer aux méthodes ci-après, deux seulement ont retenu notre attention après recherches :

L'orcanette et l'hématoxyline.

L'orcanette est applicable à la réaction du phosphate ammoniaco-magnésien, elle forme une laque bleue caractéristique avec le magnésium.

L'hématoxyline est vraiment trop connue pour que nous insistions longtemps. Ne voulant pas entrer dans des détails chimiques qui pourraient paraître des hors-

d'œuvre et de la science livresque, nous nous bornerons à signaler qu'il nous a paru que la coloration violette observée sur les tissus calcifiés colorés par la méthode de l'hématoxyline au fer, était dûe à une réaction plus complexe qu'on ne le dit généralement.

Le mordançage habituel à l'alun de fer donne cette coloration d'une façon particulièrement nette, mais le mordançage au perchlorure au sulfate de fer, donne une coloration bleue.

Le mordançage à l'alun ordinaire additionné d'une trace d'un sel de fer soluble, donne par contre une coloration violette qui manque si l'on n'a pas ajouté de fer.

Les mêmes mordançages appliqués à une alizarine donnent des résultats comparables, toutes choses égales d'ailleurs.

La possibilité de « démonter » cette coloration violette par l'acide sulfurique très étendu, nous incline à penser que la coloration violette est due non pas au calcaire seul, mais à un sel complexe renfermant de l'alumine de la chaux et simplement une trace de fer, l'alumine jouant là un rôle plus important qu'on ne l'avait dit jusqu'à maintenant.

Laques d'hématoxyline et des métaux rares (uranium, vanadium, tungstène, molybdène).

Nous rappelons que la laque d'hématoxyline se forme, dans le cas du tungstène et du molybdène, sur une combinaison phosphomolybdique, sur le vanadium par une réaction de substitution (incomplète car

les acides sont faibles); enfin, dans le cas de l'uranium, la laque se fait sur ce métal précipité à l'état de phosphate insoluble.

Avant d'exposer ces recherches, nous signalerons une cause d'erreur : les très vieilles solutions d'hématoxyline à l'alun dissolvent une petite quantité de silicates solubles du verre, et le silicium agit pour son propre compte comme un mordant : il rend les colorations diffuses et leur fait perdre, chose plus grave, leur valeur histochimique.

On se sert donc de solutions fraîches d'hématoxyline que l'on acidifie de façon plus ou moins intense suivant les résultats que l'on cherche. Quand le mordant employé est du molybdène ou du tungstène, on acidifie au moment de l'emploi la solution d'hématoxyline avec de l'acide nitrique. Cette dernière solution se garde moins bien que la solution acétique, aussi doit-elle être préparée extemporanément.

Mordants pour la recherche du phosphore :

Nous rappellerons seulement le phosphate ammoniaco-magnésien (coloration bleue du magnésium avec l'orcanette.)

Le zinc et l'étain dont les phosphates sont insolubles et qui peuvent être démontrés ensuite par la formation de phosphotungstates bleus (surtout avec les sels d'étain et ne réussit qu'à chaud).

Nous n'insisterons pas sur l'argent (réaction de Kossa).

Nous avons dit enfin l'essentiel sur la réaction du

tungstène et du molybdène, à l'état d'acide phosphotungstique ou molybdique.

Le mordant qui nous paraît le meilleur est l'uranium sous forme d'un sel soluble, acétate de préférence. Nous rappelons d'abord les caractéristiques chimiques de la réaction.

L'acétate d'urane se décompose assez facilement en ses deux éléments constitutifs, il forme un phosphate insoluble dans l'acide acétique, même pur et chaud; le phosphate est coloré en jaune, et en quantité même faible cette couleur jaune apparaît.

Il forme, avec les phosphates calciques, des sels complexes, mais il ne déplace pas la chaux; sa sensibilité dans les analyses minérales a été évaluée à 0,0005.

Parce qu'il est polyvalent l'uranium peut donner avec certains colorants des laques, c'est-à-dire des combinaisons colorées insolubles sur lesquelles les différenciateurs agiront très électivement.

Enfin, caractère extrêmement curieux et très intéressant, la laque formée par l'hématoxyline et l'urane est bleue en milieu acétique et rouge violet en solution alcaline. La laque bleue, c'est-à-dire acétique, est la seule que nous ayions retenue, car elle permet de ne conserver que les parties phosphorées, laissant au reste de la préparation une teinte jaune légèrement orangée.

Etude chimique de la réaction.

Nous prendrons d'abord pour type une coupe d'os,

dans laquelle nous avons du phosphore sous les deux formes, minérale et organique.

Sur la coupe, nous versons une quantité suffisante d'acétate d'urane en solution dans l'acide acétique glacial au tiers.

L'acétate d'urane se décompose à chaud surtout, quantitativement en phosphate d'urane et acide acétique (quelques autres sels d'urane qui sont insolubles ou peu solubles dans l'eau pourraient être eux aussi précipités si les acides voulus se trouvaient dans les tissus envisagés, mais les acides en question sont exceptionnels dans les tissus, certains mêmes n'ont jamais été signalés, tel que l'acide silicique; en tous cas, il sont, en l'état actuel de nos connaissances, tous décomposés par l'acide acétique, et retransformés en acétate d'urane).

L'acide acétique ajouté en excès dans la solution est destiné à transformer automatiquement ce qui pourrait se précipiter accidentellement (concentration par évaporation), et à garder ainsi à la réaction toute sa rigueur chimique.

En opérant ainsi, on se met donc en garde contre la première cause d'erreur : précipitation d'un autre sel d'urane que le phosphate.

Ensuite nous lavons la coupe dans de l'acide acétique glacial à 60°. Cette seconde précaution renforce la première.

Nous pouvons dès lors admettre que nous opérerons notre coloration sur un phosphate d'urane.

Nous employons comme colorant l'hématoxyline :

ce n'est pas sans raisons, car d'expériences précises que nous avons faites nous avons tiré la conclusion suivante : sur les sels d'uranium il convient de n'employer, comme réactif colorant, que ceux dont la molécule contient des chaines latérales, et l'hématoxyline est le plus employé et le plus fréquent des colorants de ce type.

Nous employons une solution d'hématoxyline mûrie artificiellement et additionnée d'alun; au bout de plusieurs jours, on acidifie par l'acide acétique en excès.

L'alun réagit lentement sur l'hématoxyline et forme une laque peu soluble. Ehrlich depuis longtemps avait montré l'importance de l'acide acétique dans cette solution, mais il ne la rendait pas acide : la proportion d'acide acétique qu'il indique n'est pas suffisante pour acidifier d'une façon durable.

Au contraire, en ajoutant, ainsi que nous le faisons, une forte quantité d'acide acétique (3 molécules pour une molécule d'hématoxyline) nous libérons complètement le colorant de sa combinaison et l'avons ainsi continuellement à son maximum d'activité.

C'est là la première action de l'acide acétique et de l'alun dans notre réactif.

Mais l'alun a encore une autre action : ce sel double d'aluminium est capable par son aluminium de donner des corps complexes, et, dans le cas de l'os en particulier, des aluminates calciques. Ces aluminates de chaux se décomposent peu à peu à chaud, sous l'action de l'acide acétique, en deux acétates solubles;

telle est la deuxième utilité de l'alun qui empêche ainsi la formation de laques trop complexes.

En troisième lieu, cet alun, toujours dans le même exemple, l'os, se comporte comme un sel d'aluminium vis à vis du phosphate organique, et si, sous l'action de l'acide acétique chaud, quelques parcelles d'acide phosphoriques venaient à être mobilisées, elles sont reprécipitées à l'état de phosphate d'aluminium insoluble sur lequel l'urane peut encore venir se fixer très facilement.

Enfin il est hors de doute que l'alun agit comme mordant, et ainsi que l'ont montré les recherches de l'industrie, les mordants doivent toujours de préférence être doubles plutôt que simples : l'alun favorise donc la fixation du colorant sur l'urane, et son caractère basique affermit la solidité naturelle de la laque.

Dans la composition de ce réactif, il n'entre donc aucun corps susceptible d'altérer la rigueur chimique de la réaction.

La coupe lavée dans l'acide acétique glacial chaud (1) est essuyée sur la face opposée à la coupe,

Les expériences ont montré que le seul temps délicat de la méthode était le mordançage; si celui-ci a été fait en prenant toutes les précautions voulues, il suffit pour éviter les causes accidentelles d'erreur de colorer dans l'hématoxyline acétique, la différenciation terminale dans l'acide acétique peut donc être supprimée sans gros inconvénient. Nous recommandons toutefois la méthode étudiée ci-dessus en détail, car elle offre dans tous ses temps toute la rigueur chimique désirable.

(1) Certaines coupes, telles que celles du cartilage, résistent

l'autre face restant humide d'acide acétique. On verse sur la lame une quantité suffisante d'hématoxyline. On colore à chaud pendant quelques minutes.

La coupe est différenciée dans l'acide acétique glacial au tiers, lavée vivement dans l'eau distillée, deshydratée et montée au baume.

Toutes ces manipulations ont été faites en milieu acétique afin que les sels d'urane autres que le phosphates soient dissous par l'acide acétique. Comme, d'autre part, la laque d'hématoxyline sur urane est bleue en solution acétique, nous pourrons avoir la certitude 1° d'avoir fait une laque sur urane puisque cette laque est bleue en solution acétique; 2° que c'est bien le phosphate qui a servi de base à la laque, puisque le sel ne s'est pas dissous dans l'acide acétique.

Il reste un dernier point à traiter avec quelques détails : la différenciation. Quand on veut différencier une laque, on peut agir de deux façons : attaquer le mordant, c'est-à-dire la partie métallique de la laque, c'est ce que nous faisons en différenciant dans l'acide acétique glacial; ou attaquer la couleur elle-même (1) par un solvant approprié, or l'hématoxyline est soluble dans l'alcool, cette deuxième différenciation est réalisée par un passage plus prolongé que d'ordinaire dans l'alcool absolu qui précède le xylol.

mal à l'acide glacial, dans ce cas diluer l'acide dont on prolonge l'action.

(1) L'hématoxyline s'attaque également par l'acide acétique, c'est pourquoi il est meilleur de diluer l'acide qui sert à la différenciation.

Telle est la marche de la réaction appliquée à la recherche du phosphore minéral. La recherche du phosphore lié à un radical organique est un peu différente, elle est surtout, quand il faut la raisonner, beaucoup plus complexe.

La formation du phosphate d'urane insoluble est rapide, complète; quand il s'agit du phosphore minéral, elle est lente, partielle et demande beaucoup plus de soins.

L'acide acétique réagissant à chaud sur un complexe protéique a des actions bien différentes, suivant les concentrations employées et la température.

La substance fondamentale du cartilage par exemple se gonfle dans l'acide acétique étendu et chaud, jusqu'aux environs de 80°; de 80° à 110° (suivant la concentration de l'acide), l'action devient coagulante, puis, si on la prolonge, la substance fixe une certaine quantité d'acide acétique et devient soluble.

Il faut donc de toute nécessité observer pour la recherche du phosphore organique un certain nombre de précautions :

a) La température de la réaction ne dépassera pas 55-60°;

b) La teneur en acide acétique sera abaissée à 1 %;

c) Le mordançage sera plus prolongé, une heure à deux heures environ;

d) La différenciation se fera dans de l'acide acétique très étendu, à 3 ou 4 %, et sera plus prolongée que dans le cas du phosphore minéral.

La réaction du phosphate d'urane est donc appli-

cable aux deux espèces de phosphore que nous pouvons avoir à étudier : fréquemment toutefois, et seulement dans ce cas, nous conjuguons la méthode à l'urane et celle au vanadium.

Le premier mordançage au vanadate d'ammoniaque déplace le radical phosphore et le remplace par le radical vanadium, on fait ensuite le traitement par le sel d'urane; il se forme un complexe phosphovanadate d'uranyle qui, par la multiplicité des métaux polyvalents qu'il offre à l'hématoxyline donne une laque plus riche et plus fournie; il n'y a qu'une remarque à faire : la laque vanadium hématoxyline est violet rouge et fait passer la teinte violet bleu de la laque urane hématoxyline vers le violet rouge, la couleur est de ce fait un peu moins tranchée.

Nous terminerons cette étude en signalant deux méthodes de chimie analytique pour reconnaître les lécithines.

Casanova (1) emploie une solution à 10 % de molybdate d'ammoniaque qui, additionnée d'acide sulfurique concentrée, donne une coloration rouge cerise avec les lécithines, la réaction fait défaut avec la cholestérine et la phytostérine

Malengrau et Prigent (2) utilisent une solution alcoolique de bromure ou d'iodure de fer, qui donne avec les lécithines un précipité coloré en rouge brun.

(1) Casanova. *Boll. chim. Farm.*, t. 50, p. 309, 1911.

(2) Malengrau et Prigent. *Zeitsch. f. Physiol. chem.*, t. 73, p. 68, 1911.

Résultats Biologiques

CELLULES CALCIGÈRES DE L'HÉPATO-PANCREAS CHEZ HELLIX

Camillo Schneider, dans son livre sur l'histologie comparée des animaux, décrit, comme les autres classiques, trois types de cellules dans l'hépato-pancréas. Nous n'aurons en vue ici que les cellules qui renferment du calcaire et nous étudierons l'évolution des cellules calcigères et de leur contenu en été, en hiver et au printemps.

En été, la cellule calcigère se présente sous forme d'une cellule triangulaire dont la base touche la membrane conjonctive d'enveloppe, mais dont le sommet n'arrive pas en général à la lumière de l'acinus. Cette cellule, beaucoup plus large que haute, présente un gros noyau (quelques auteurs décrivent plusieurs noyaux, jusqu'à cinq) très riche en chromatine, ayant un gros nucléole. Les réactifs du phosphore montrent que cette chromatine est tellement abondante qu'elle paraît faire saillie à la surface de celui-ci, et lui donne, toutes choses égales d'ailleurs, l'aspect épineux d'une

châtaigne ou d'un fruit de Datura. Ce noyau nous a toujours paru unique, mais il est fréquent de rencontrer dans une même cellule un ou deux grains aussi volumineux que le noyau dont ils ont un peu l'aspect avec l'hématoxyline au fer. Ces grains étudiés par l'alizarine se montrent comme formés de chaux, mais leur centre est occupé par une petite masse à peu près régulièrement arrondie; cette masse se colore difficilement, on peut arriver à la colorer presque électivement au moyen de certains extraits de bois, en particulier par l'extrait de Québracho, l'extrait de Cachou et d'Acacia; dans ce cas, la petite masse centrale prend une teinte sombre comme celle que prennent les matières organiques.

On pourrait peut-être penser à un dépôt calcaire se formant sur un centre organique.

Ces grains calcaires sont volumineux, à côté d'eux on en trouve un bien plus grand nombre qui sont plus facilement colorables par l'alizarine et dont la texture semble homogène. D'après les analyses de Barfurth on aurait affaire à du phosphate acide de chaux. Ces grains se colorent en effet par les réactifs du phosphore, tandis que les grains plus gros, d'aspect pseudo-nucléaires, ne se colorent pas par les mêmes réactifs.

De plus, la réaction du phosphore se montre positive, mais de façon légère dans l'ensemble du tissu conjonctif et dans les cellules d'aspect muqueux que l'on voit autour de l'hépato-pancréas.

Le canal excréteur du foie montre deux types de cellules différentes (fig. 2). D'abord des cellules hautes

et claires, à noyau situé dans la partie moyenne de la cellule; le noyau fusiforme ne fait pas saillie sous la membrane cellulaire. Ces cellules ne nous ont jamais montré de grains de sécrétion.

Puis des cellules plus volumineuses dont la forme cylindrique n'est jamais régulière, le noyau gros est situé dans les deux cinquièmes basaux de la cellule, mais il ne touche jamais la couche conjonctive sous-jacente. Les grains de sécrétion, assez gros, arrondis, sont toujours au moins juxtanucléaires, plus souvent ils sont anténucléaires.

La cellule porte une bordure en brosse, courte, serrée, on a pu saisir parfois des grains ayant englué plusieurs cils et sortant dans la lumière du canal.

Exceptionnellement dans ces cellules le noyau était, sans aucun artifice préalable, moins colorable que le cytoplasme.

Au point de vue chimique, ces grains présentent, exactement superposables, les réactions de la chaux et celle du phosphore.

La structure apparente de ces grains est homogène, ils ne présentent aucune formation cristalline et offrent le plus souvent la réaction du mucus à leur pourtour.

Il s'agit de phosphates de chaux, et l'aspect tout à fait amorphe n'entraîne la conviction vers aucune forme de phosphate plutôt que vers une autre.

En résumé il y a, à cette période de l'année, une élaboration et une excrétion de calcaire simultanées, avec toutefois présence de grains plus volumineux à centre organique, à aspect parfois irrégulier comme

s'ils englobaient des cristaux, moins solubles, que nous reverrons plus tard à la période d'hiver.

Désireux de connaître quel serait le mode d'excrétion du calcaire, si l'on mettait l'animal en demeure de vivre sur ses réserves, nous avons soumis un lot de 60 hélix au jeûne absolu.

Il nous manque bien entendu un certain nombre de données, aussi considérerons-nous les images que nous verrons comme une série de stades d'un même travail physiologique, et nous bornerons au strict minimum nos considérations.

Le jeûne a duré au total 21 jours, à cette date il ne restait plus que cinq animaux vivants, encore deux d'entre eux étaient-ils probablement bien proches de leur fin.

Les animaux ont donc été sacrifiés en trois séries distinctes : la première série le jour même de la capture, les autres au bout de dix jours, les derniers enfin quand, la plupart des sujets étant morts, nous avons craint de ne pouvoir plus faire aucune observation utile.

La première série n'a rien montré que nous ne connaissions déjà.

La deuxième série, au contraire, a fourni les documents suivants :

On remarque tout d'abord l'abondance de la sécrétion muqueuse chez ces animaux.

L'hépato-pancréas montre des modifications structurales intéressantes (fig. 7) (nous n'avons en vue bien entendu que les cellules calcigères). Il y a forma-

tion d'un grand nombre de vacuoles, soit que le contenu de ces vacuoles se soit dissous dans le fixateur, ce qui suppose qu'il est devenu soluble, soit qu'il ait disparu spontanément. Il reste une certaine quantité de substances calcaires mais elles sont ici à peu près uniquement représentées par les gros grains à aspect pseudo-nucléaires que nous avons signalés; les petits grains sont exceptionnels; ces gros grains se colorent plus vivement par l'alizarine et si l'on rapproche ce fait de cet autre, à savoir que l'intensité d'une laque colorée est directement proportionnelle au coefficient de solubilité du sel métallique qui forme la laque, on doit admettre que ces grains sont en voie de transformation et deviennent solubles : d'ailleurs dans certaines cellules on les voit se fragmenter.

Si l'on étudie dans ces mêmes cellules la réaction du phosphore, on voit que cette réaction très intense est limitée au stroma qui limite les vacuoles.

Le tissu conjonctif périacineux présente la réaction de la chaux et celle du phosphore.

Les cellules muqueuses sont gonflées d'un liquide clair que les fixateurs réduisent en une masse anhiste dans laquelle baignent de petits grains phospho-calcaires. Les noyaux de ces cellules, habituellement petits, sont gonflés, on y voit un nucléole et des grains de chromatine (fig. 4).

Entre les cellules muqueuses et le tissu conjonctif de soutien du canal excréteur on trouve encore des grains calcaires.

Les cellules du canal excréteur groupées en festons,

sont dans la partie saillante du feston de 6 à 8 fois plus hautes que larges, le noyau ne dépasse jamais le milieu de la cellule et en occupe généralement les 2/5e postérieurs. Quelquefois on trouve dans la base de la cellule un gros amas calcaire de forme pseudo-nucléaire, mais le plus souvent la réaction est diffuse, limitée à la partie rétro-nucléaire, c'est-àdire basale de la cellule; dans la partie anténucléaire, la chaux se présente sous forme de grains, on en a saisi dans les cils de la bordure en brosse ou même dans la lumière du canal excréteur.

La figure 1 montre la diffusion de la réaction calcaire dans toute la hauteur d'une cellule, les cils paraissent englués, il n'y a aucun grain.

La figure 3 montre la même réaction chez l'un des sujets de la dernière série; les cellules affaissées, déformées montrent, à côté de quelques grains isolés, des réactions aussi diffuses qu'intenses du calcaire : mais ici la réaction s'était montrée localisée à la partie apicale de la cellule; quand aux cellules calcigères de l'hépato-pancréas, elles étaient simplement remarquables par la disparition presque complète de la réaction de la chaux, et celle-ci devenue diffuse intéressait la partie basale de la cellule, le tissu conjonctif périacineux; la réaction du phosphore était parallèle.

En hiver, la cellule calcaire présente un aspect tout à fait caractéristique (fig. 8). Elle est globuleuse, ramassée sur elle-même, n'atteint jamais la lumière de l'acinus. Le noyau, très gros, contient un gros nucléole et peu de grains de chromatine, il est vivement colo-

rable par les réactifs du phosphore, et rejeté à la base de la cellule. Le stroma cellulaire périnucléaire limite un grand nombre de vacuoles, vides pour la plupart : ce stroma présente la réaction du phosphore.

La partie antérieure de la cellule et bien souvent les 2/3 antérieurs de cette cellule sont occupés par une énorme masse, d'aspect nettement cristallin, formée de cristaux peu solubles dans l'eau, décomposables avec effervescences dans les acides forts; ces caractères, joints à leur forme cristalline, nous inclinent à penser que nous sommes en présence de cristaux d'oxalate de calcium. C'est en effet la forme cristalline de la chaux la moins encombrante volumétriquement, en même temps que la plus facilement décomposable par les acides phosphoriques.

Autour de ces masses cristallines, incluses dans une grande vacuole (artefact), on voit de petites masses arrondies, facilement colorables par l'alizarine et qui représentent une forme plus soluble des sels de chaux. Pour obtenir la réaction de l'alizarine sur ces masses cristallines, on doit prolonger le mordançage ou mieux colorer à l'étuve, directement dans une solution très légèrement sulfurique d'alizarine sulfonique. On observe alors deux modifications intéressantes : la forme cristalline se modifie un peu, et on peut voir des formes en queue d'hirondelle caractéristiques du sulfate de chaux, ensuite les cristaux se colorent seulement à leur périphérie, peu ou pas à leur centre; ce centre à son tour se colorant en brun par les extraits de bois tannants.

Il y a donc analogie complète entre l'image de ces gros amas cristallins et les petits cristaux à centre organique signalés précédemment.

Il s'agit dès lors indiscutablement d'oxalate de chaux se transformant en sulfate, c'est un des rares exemples de combinaison d'une réaction purement minérale avec une matière colorante.

L'absence complète de réaction de la chaux et du phosphore dans le tissu conjonctif périacineux et dans le canal excréteur montre que l'excrétion calcaire est dans la période d'hiver aux environs de zéro.

Au printemps, au moment où l'escargot ramollit son épiphragme, il secrète un mucus fortement acide qui se teinte en jaune par les solutions d'urane. Ce mucus n'est pas coagulé par les solutions de phosphate acide de soude, il est par contre coagulé par l'acide acétique.

Une coupe du pied de l'escargot à ce moment montre une très abondante sécrétion phosphorée, ainsi qu'en témoigne la figure 9. Cette sécrétion présente dans presque tous ses grains la réaction du mucus.

L'hépato-pancréas, figure 6, présente les particularités suivantes : la cellule calcaire à un gsos noyau bourré de chromatine, cette chromatine donne alors l'aspect en châtaigne, vu pendant l'été. Le stroma cellulaire est vacuolaire et la réaction du phosphore y st fortement positive, les grosses masses cristallines se résolvent peu à peu en petits grains arrondis qui se colorent facilement par l'alizarine.

La réaction du phosphore devient peu à peu posi-

tive dans le tissu conjonctif, le canal excréteur prend un aspect qui ne rappelle pas celui de l'Hélix en été.

Les noyaux se gonflent, deviennent clairs, et leur chromatine abondante se masse en grains : le nucléole, quand il est visible, est gros et rejeté à la base du noyau.

Fusiforme dans l'ensemble, il n'est pas rare de voir ce noyau soulever la membrane cellulaire.

Ou bien, au contraire, le noyau très allongé et petit occupe la partie moyenne d'une cellule absolument claire et privée d'inclusions granuleuses. Les cellules à gros noyau contiennent au contraire toujours des grains de sécrétion.

Dans la partie apicale de la cellule, les grains se concrètent en masses, agglutinés les uns aux autres par une substance métachromatique (mucus). Les grains sont gros, polygonaux (peut-être par pression réciproque), la réaction du phosphore y est très nette, de même que la réaction de la chaux; on doit donc dire, sécrétion muqueuse phospho-calcaire.

C'est en somme, à un degré bien moindre, ce que nous a montré l'Hélix pendant le jeûne.

LA CALCIFICATION CHEZ LES VERTEBRES SUPERIEURS

Sans préjuger des modifications chimiques qui peuvent affecter le support organique du calcaire, nous nous bornerons à montrer la marche du calcaire dans une calcification :

1° *Os de membrane.* — Nos recherches n'ont pas porté spécialement sur ce type de calcification, nous avons simplement observé l'apparition de petits grains calcaires sur les fibres collagènes, avant que celles-ci n'aient disparu ou se soient confondues avec l'os en formation (fig. 13).

2° *La calcification des os longs.* — La réaction de Kossa montre l'apport de calcaire se faisant sous forme de petits grains qui peu à peu s'accolent jusqu'à former des nappes. Aucune méthode ne nous avait montré de figure semblable.

Partant de cette idée, que nous avons souvent vérifiée, à savoir que la laque se forme d'autant mieux, et est d'autant plus intense que le corps est plus soluble, nous avons essayé de transformer in situ le phosphate de chaux qui arrivait dans l'os, en un sel un peu plus soluble, mais qui présente cependant des possibilités d'insolubilisation, afin d'éviter sa fuite dans le liquide conservateur.

La solution nous a été fournie par le glycérophosphate; en ajoutant quelques gouttes de glycérine anhydre a de l'alcool anhydre on obtient un liquide dans lequel lentement se fait l'éthérification dse valences libres de l'acide phosphorique, le sel étant insoluble dans l'alcool ne se déplace pas; au bout de deux mois la réaction est à peu près terminée, on traite les pièces comme à l'habitude.

On colore par l'alizarinate d'ammoniaque ou l'aliza-

rine sulfonique, c'est ainsi qu'on a traité les pièces qui ont donné les figures 10, 11 et 12.

Nous avons observé alors des figures identiques à celles qu'a données, sur les mêmes pièces, la réaction de Kossa.

Les trois figures représentent trois points d'un même os. d'abord apport de petits grains, puis agglomération de ces grains qui restent encore distincts, puis fusion en plaques polycycliques, enfin en plaques plus grandes à contours toujours arrondis.

Si, sur ces mêmes pièces, on fait la réaction du phosphore on constate qu'elle est identique comme aspect et comme topographie, mais qu'elle est plus marquée, en ce sens que les grains les plus petits sont plus gros que les grains calcaires les plus petits, que d'autre part les formations en nappe ont des contours beaucoup plus flous.

De là à penser qu'il doit y avoir une proportion de phosphore supérieure à la quantité de chaux il n'y a qu'un pas; nous avons essayé de vérifier cette nouvelle donnée au moyen de l'expérience suivante :

Etant donné un sel acide de chaux, que nous savons être un phosphate, il faut le saturer en fixant un métal quelconque qui forme un corps bien défini et insoluble.

Ce métal, c'est le baryum.

La figure 16 donne le résultat de l'expérience instituée sur un os long préalablement décalcifié (1).

(1) La décalcification détruit complètement (acide et base)

La substance, complètement calcifiée, ne s'est plus colorée puisque la chaux en a complètement disparu. Au contraire la substance pré-osseuse a pu fixer de la baryte, sous forme d'un phosphate mixte de chaux et de baryte, et la coloration manifeste d'une façon précise cette fixation secondaire.

les sels de chaux tribasiques, mais l'acide nitrique en solution alcoolique ne détruit pas la substance organique qui sature temporairement les valences libres des sels acides de chaux, l'acide phosphorique peut donc être saturé par un réactif ayant en même temps un pouvoir d'hydrolyse comme l'eau de baryte très chaude, et employée pendant longtemps. Nous pensons d'autre part que l'action antérieure de l'acide nitrique n'est pas étrangère à l'attaque devenue si facile de ce support organique.

CONCLUSIONS

Les méthodes que l'on peut employer pour la recherche histologique du phosphore lié à la chaux, ou du phosphore et de la chaux libres ont été réparties en deux groupes : méthodes chimiques pures ou méthodes analytiques, et méthodes mixtes, c'est-à-dire réaction chimique combinée à celle d'un réactif colorant.

Pour la chaux, le réactif de choix est l'alizarine qui peut, avec les méthodes que nous avons indiquées, donner des résultats extrêmement précis.

Pour le phosphore, on peut former sur lame, par l'acide correspondant :

a) Un phosphotungstate, un phosphomolybdate, susceptible de former ensuite par son tungstène ou son molybdène une laque avec un colorant approprié.

b) Un vanadate, par déplacement du phosphore.

c) Un phosphate d'uranium, beaucoup plus intéressant par ce qu'il donne ensuite des laques extrêmement fines se prêtant à toutes les investigations.

Les applications biologiques de ces méthodes ont montré que :

1° Chez les invertébrés (hépato-pancréas de l'Hélix) :

a) L'excrétion du calcaire se fait sous forme de phosphate acide, tandis que le calcaire en réserve est sous forme d'oxalate;

b) Le ramollissement de l'épiphragme au printemps est dû à l'action du mucus sécrété par l'animal en grande abondance à ce moment, mucus chargé d'un phosphate acide, de soude probablement;

c) Le jeûne expérimental amène une excrétion abondante du calcaire, plus rapide et plus intense que celle que l'animal réalise normalement au printemps.

2° Dans les tissus de soutien, en voie de calcification, des vertébrés :

a) Le phosphore est apporté sous forme de grains;

b) Il est présent dans les tissus avant que n'apparaisse la réaction de la chaux.

3° La décalcification artificielle n'atteint, si elle n'est pas trop brutale, que le phosphore minéral, ce qui explique :

a) Que l'on puisse fixer de la chaux ou de la baryte sur lames dans la substance dite pré-osseuse;

b) Que la réaction du phosphore soit plus intense dans cette région que dans la partie axiale de la travée directrice. L'apport du phosphore se fait probablement dans l'os diaphysaire par la cavité médullaire, et dans le cartilage par les canaux vasculaires.

4° Il persiste, dans les tissus artificiellement privés

de leurs combinaisons minérales, une affinité chimique pour ces mêmes substances : si on essaye d'y fixer des corps voisins, c'est-à-dire appartenant à la même série du système périodique des éléments, le résultat est plus rapidement atteint si le poids moléculaire du corps utilisé est très voisin de celui du corps primitif. Nous avons mis à profit ces propriétés pour fixer à nouveau, sur les os décalcifiés, du phosphore au moyen de l'acide phosphotungstique ou du phosphate acide d'éthyle.

Vu : Bon à imprimer :
Le Président de Thèse,
PRENANT.

Vu et PERMIS d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
APPELL.

Vu :
Le Doyen,
ROGER.

BIBLIOGRAPHIE

1° Généralités :

Behrens et Kley. — *Analyse microchimique*, 4e édition, Leipsig, 1920.

Stoltzen. — *Wirchow Archiv.*, T. 180, 1905.

Encyclopédie Ehrlich. — Article Verkalküng.

W. H. Schultze. — *Ergebrisse für All. Path.*, von Lubarsch, T. XIV, 1910.

Rott. — Calcaire dans les écailles de poissons. *Anat. Anzeiger*, 1920.

Camillo Schneider. — *Traité d'Histologie comparée des animaux*, 1902, p. 569-571.

Cuénot. — *Archives de Biologie*, T. 16.

— *Arch. de Zool. expérimentale*, T. 16, 1899.

Dastre. — *J. Physiol. et Pathol. générale*, T. 1, 1899.

Arcangeli. — Recherche du phosphore. *Gaz. chim. Italiana*, T. 37, 2e partie.

Mummery Howard. — Comparatives St. calcif. *Proc. R. Soc. of Med.*, T. 9, n° 2, odont. sect., p. 6-31.

Cretin A. — *Congrès des Anatomistes*, Gand, 1922.

Grünbaum. — *Société de Biologie*, T. 75, p. 208.

Desgrez. — *Chimie Médicale*, Paris, 1921, p. 187 et *passim.*

Gautier. — *Cours de Chimie*, Paris, 1892, *passim.*

Prenant, Bouin, Maillard. — *Traité d'Histologie.*

Richter et Anschütz. — *Traité de Chimie organique*, 1918.

Abderhalden. — *Biochemicsher Handlexikon*, 1907.

Berthelot. — *Chimie organique*, 1898.

Hanriot, Carré, Seyewetz, Charabot et Hébert. — *Principes d'analyse et de synthèse en chimie organique.*
Wahl. — *Matières colorantes.* Doin, 1921.
Hollemann. — *Chimie organique,* 1920.
— *Chimie minérale,* 1921.
Lefèvre. — *Matières colorantes.* Masson, 1896.

Bibliographie des matières colorantes

Alizarine : Græbe et Liebermann.
Moniteur scientifique, 1869, 384-465.
— — 1870, 447.

Hematoxyline :
Berichte, vol. 36, p. 1561 et p. 2202.
Chemischer Zeitung, 1902, T. II, p. 750.
Annales de Liebig, T. 216, p. 236. Hématéine. Rupe die Chemie der Nat. Farbst.

Carmin :
Chemisch. Centralblatt, 1902, T. II, p. 744.
Dimroth Kammerer. Ber. T. LIII [B], 1920, p. 471.

Kermès :
Annales de Liebig, T. 399, p. 1 à 90.
T. 411, p. 315-338.

Orcéine :
J. pr. Chemie, T. 58, p. 465.
Annales de Liebig, T. 288, p. 14.
T. 306, p. 282.
T. 310, p. 230.
T. 310, p. 281.
T. 324, p. 139.

II. — Chaux et phosphore.

Calcium :
Oxalate : T. W. Richards. Z. f. an. Chem., n° 28, 1901, p. 85.
O. M. Shedd. Soil. Soc., T. X, 1920.
Iodates (Ca, Sr, Ba) :

DENIGÈS. C. R., T. C, 1920, p. 996.
C. R., T. CLXXI, 1920, p. 633.

Molybdate de strychnine (chaux en présence de baryte) : DÉBOURDEAUX. Bull. S. Pharm., XXVII, p. 70, 1920.

Aluminate de chaux : Consulter les traités classiques de matières colorantes et de teinture.

Phosphore :

Argent : KOSSA. Ziegler Beitr., T. 29, 1901.

Fer : Réaction à la Diphénylamine :

HAÜN. Z. n. genusmitt, T. XXXI, 1920, p. 335.

E. M. HARVEY. J. Amer. chem. Soc., T. XLII, 1920, p. 1245.

Manganèse :

FEIGL. Ch. Zeit., T. XLIV, 1920, p. 689.

— Œsterr. Chem. Zeit., XXII, p. 124.

Magnésium : Réaction d'Eisenlohr :

EISENLOHR. Ber., T. LIII (B), 1920, p. 1476.

Tungstène :

BEDFORD. Note sur le tungstène. Sheffield, 1893.

E. DEFACQZ. C. R. Ac. Sc., 1896.

J. H. PRATT. Tungstène, molybdène, uranium, vanadium. 25e année, Rep. of un stat. geo. survey, 1899, 1900, 1902, 1903, 1905.

M. DÉLÉPINE. C. R. Ac. Sc., 1900.

Uranium : Coloration avec salicylate de soude :

MÜLLER. Chem. Zeit., T. XLIII, 1919, p. 739.

Explication des Planches

1. — Excrétion du calcaire par nappes deux jours avant la fin de l'expérience.
2. — Excrétion normale pendant l'été.
3. — Excrétion chez individu ne réagissant plus à la piqûre (forme des cellules).
4. — Cellules du tissu conjonctif gonflées de mucus, avec quelques grains calcaires.
5. — Cellules hépatiques (Agrilomax agrestis).
6. — Excrétion période d'hiver.
7. — Vue d'ensemble, chez l'escargot soumis au jeûne (à la fin du jeûne).
8. — Excrétion du phosphore à la fin du jeûne.
9. — Excrétion du phosphore dans pied d'escargot fondant son épiphragme.

10-11-12. — 3 stades de la calcification d'un cartilage, chez un embryon de porc 53 $^{m}/^{m}$.

13. — Ossification d'os de membrane, chien 50 $^{m}/^{m}$.

14-15-16. — Recherche du phosphore.

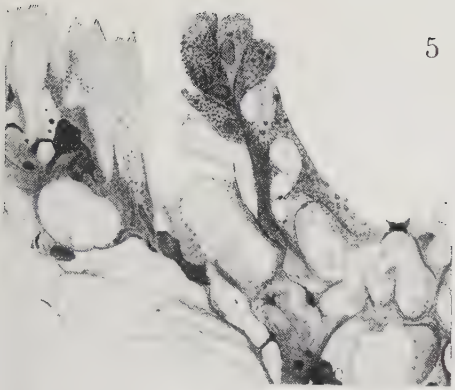
14 et 15, dans le cartilage.

16, dans les os décalcifiés (réaction surtout accentuée sur le bord de la travée).

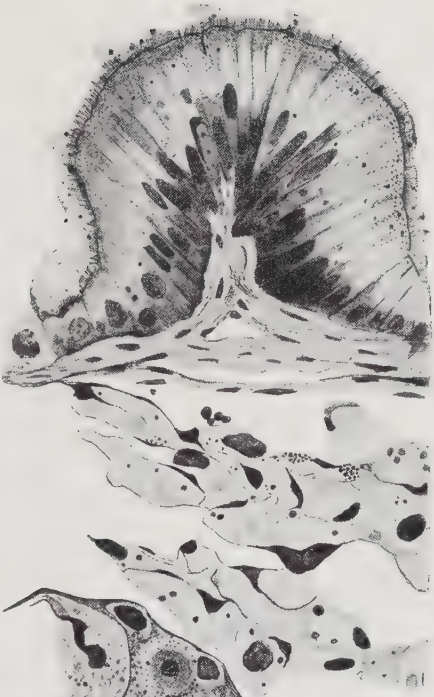
17. — Mâchoire de chat à terme. Fixation acide trichloracétique dans formol salé.

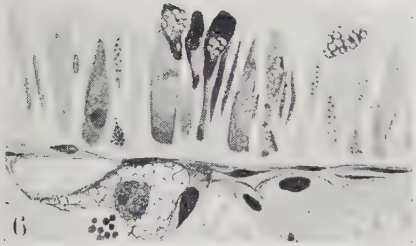
Le phosphore organique est sous forme de grains.

Imprimerie spéciale de la Librairie Marcel Vigné
13, rue de l'École de Médecine, Paris.

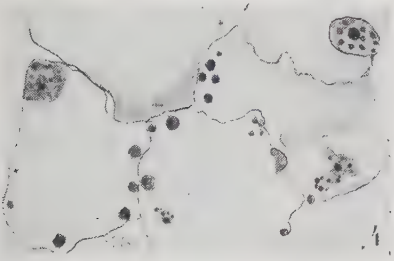


5





6



4

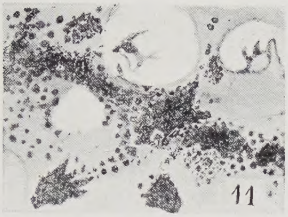
7

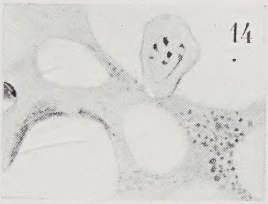
3

1

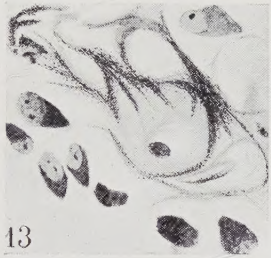
2

8


11

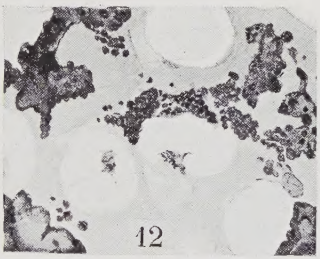

14

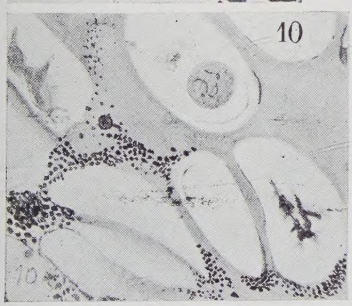
16

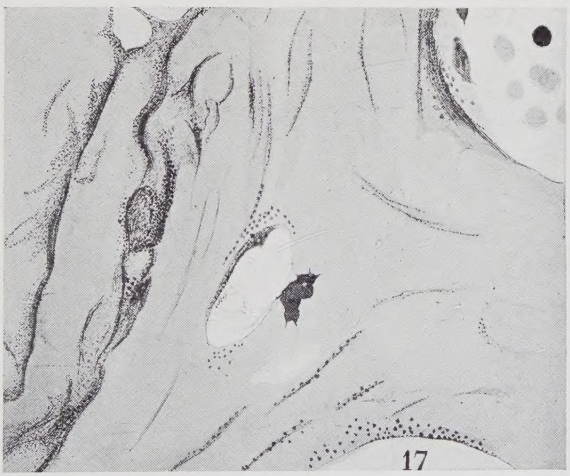

13

9

15


12


10


17